

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
am Klinikum der Justus Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. G. Lasch

**Experimentelle und klinische Untersuchungen
zur Frage der Komplexbildung zwischen
Fibrinogen und seinen Derivaten unter Verwendung
insolubilisierten Fibrinogens und Fibrins**

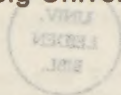
HABILITATIONSSCHRIFT
im Fachbereich Humanmedizin der
Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Fritz Reinhard Matthias
Gießen 1974

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
am Klinikum der Justus Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. G. Lasch

**Experimentelle und klinische Untersuchungen
zur Frage der Komplexbildung zwischen
Fibrinogen und seinen Derivaten unter Verwendung
insolubilisierten Fibrinogens und Fibrins**

HABILITATIONSSCHRIFT
im Fachbereich Humanmedizin der
Justus Liebig-Universität Gießen



Vorgelegt von
Fritz Reinhard Matthias
Gießen 1974



Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung, Abgrenzung der Thematik</u>	1
B. <u>Theoretischer Teil: Biochemie des Fibrinogens und seiner Derivate</u>	4
1. Fibrinogen	4
2. Gerinnung	14
3. Fibrino(-geno-)lyse	23
4. Komplexbildung zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten	31
5. Phänomenologie umsatzbedingter Haemostasestörungen	37
C. <u>Experimenteller und klinischer Teil:</u>	39
I. Beschreibung übernommener und modifizierter Methoden	39
II. Beschreibung neu entwickelter Methoden und Verfahren	45
1. Herstellung und Verhalten von insolubilisiertem Fibrinogen	45
a. Insolubilisierung von Fibrinogen und Umwandlung in insolubilisiertes Fibrinmonomer	45
b. Untersuchungen zum Verfahren der Insolubilisierung - Verhalten insolubilisierter Fibrinogens und Fibrins	48
c. Diskussion der Ergebnisse	53
2. Ein Verfahren zur Präparation und Trennung von Fibrinogenspaltprodukten	58
a. Einleitung	58
b. 1) Herstellung und enzymatisches Verhalten von insolubilisiertem Plasmin	59
2) Diskussion der Methode	64
c. 1) Verfahren zur Trennung der Lyseendprodukte	66
2) Diskussion der Methode	68

	<u>Seite</u>
III. Versuche zum Adsorptionsverhalten von Fibrinogen und seinen Derivaten an insolubilisiertes Fibrinmonomer	70
1. Einleitung	70
2. Chromatographieversuche mit insolubili- lisiertem Fibrinmonomer	71
3. Inkubationsversuche zur Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinogen und Fibrinmonomer	73
a. Ausmaß und zeitlicher Verlauf der Adsorption an insolubilisiertes Fibrinmonomer induziert durch Thrombin (FM_t -ag)	73
b. Vergleichende Studien zur Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinmonomer induziert durch Reptilase (FM_r -ag) und Thrombin (FM_t -ag)	76
c. Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinmonomer (FM_t -ag) bei unterschiedlichen Säure-Basen-Verhältnissen	78
4. Diskussion der Ergebnisse	79
IV. Reduktion insolubilisierten Fibrinogens	87
1. Einleitung	87
2. Methodik und Ergebnisse	87
3. Diskussion	89
V. Untersuchungen zur Adsorption von Fibrinmonomer aus Plasma an insolubilisiertes Fibrinogen und klinische Anwendung	91
1. Einleitung	91
2. Versuchsbedingungen und Ergebnisse	91
3. Diskussion	98
D. <u>Abschließende Diskussion und Zusammenfassung</u>	103
E. <u>Literaturverzeichnis</u>	106

A. Einleitung, Abgrenzung der Thematik

Fibrinogen ist das letzte Substrat in einer Kette enzymatischer Reaktionen im Ablauf des Gerinnungsprozesses. Dem nach Thrombineinwirkung durch Abspaltung der Fibrinopeptide entstehenden Fibrin, das mit den Thrombocyten und der Gefäßwand als funktionelle Trias gesehen werden muß, kommt eine Schlüsselfunktion im Ablauf der Haemostase zu. Jeder haemostatische Defekt findet letztlich seinen Ausdruck in der Menge und der Qualität des gebildeten Fibrins. Dabei ist es von Bedeutung, daß Fibrin bei bestimmten Gerinnungsstörungen, bevor es zu einem Gerinnsel polymerisiert, bis zu einer Konzentration, die von der zirkulierenden Fibrinogenmenge abhängig ist, gelöst als Fibrinmonomer in Form von Fibrinmonomer-Fibrinogen-Komplexen im Gefäßsystem vorliegen kann. Fibrinogen und Fibrin sind darüberhinaus Substrate eines mit der Gerinnung konkurrierenden und unter dem Gesichtspunkt der physiologischen Haemostase die Gerinnung ergänzenden Enzymsystems der Fibrinogenolyse bzw. Fibrinolyse, dessen aktives Endenzym Plasmin ist. Die Spaltprodukte des Fibrinogens und des Fibrins sind in der Lage, wie das Fibrinogen selbst sogenannte lösliche Komplexe mit vorhandenem Fibrinmonomer zu bilden. Eine ausgewogene, aufeinander bezogene Aktivität beider Systeme ist Voraussetzung für die Integrität des Gefäßsystems und die Funktionsfähigkeit des Gefäßinhalts.

Im Verlauf zahlreicher Erkrankungen kann es zu einer generalisierten Aktivierung des Gerinnungssystems mit und ohne konsekutive Stimulierung des fibrino(-geno-)lytischen Potentials und, in seltenen Fällen, auch zu primären Fibrinogenolysen kommen. Diese Zustände, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird, erlangen häufig im Ablauf des Krankheitsgeschehens eine dominierende Rolle; sie leiten im Falle eines mehr lokalisierten Geschehens über eine massive Thrombose mit nachfolgender Embo-

lie oder über einen totalen Zusammenbruch der Haemostase im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie (LASCH et al. 1961a; LASCH et al. 1967; LASCH 1969) den deletären Ausgang der Erkrankung ein. Unter therapeutischen Aspekten wäre eine frühzeitige Erfassung der sich entwickelnden Gerinnungsstörung vor der klinischen Manifestation von eminenter Bedeutung. Eine Bestimmung der letztlich verantwortlichen Enzyme Thrombin und Plasmin im Plasma wäre denkbar, stößt aber wegen der immer vorhandenen inaktivierenden Antithrombine und Antiplasmine auf erhebliche methodische Schwierigkeiten. Eine direkte Erfassung und Quantifizierung der Endprodukte der Gerinnung und der Lyse, Fibrin und Spaltprodukte, aus dem Plasma bzw. Serum in der Frühphase des Prozesses wäre ideal und erbrächte den direkten Beweis für einen pathologisch gesteigerten Umsatz der Haemostasefaktoren bis hin zu den aus klinischer Sicht entscheidenden Substraten Fibrinogen und Fibrin. Für Fibrin ist das nur möglich, solange es als Fibrinmonomer im Komplex mit Fibrinogen oder Spaltprodukten in löslicher Form zirkuliert. Zahlreiche Versuche sind in dieser Richtung unternommen worden, die jedoch immer nur einen mehr indirekten Beweis für das Vorhandensein der Fibrinogenderivate erbracht haben und eine exakte Quantifizierung nur bedingt ermöglichen.

Als Konsequenz der geschilderten Problematik galt es erstens, eine Methodik zu entwickeln, die eine selektive Isolierung und nachfolgende Quantifizierung von Fibrinmonomer und Spaltprodukten aus Plasma bzw. Serum erlaubt; die Arbeit beschreibt im Folgenden ein Verfahren, das nach dem Prinzip der Komplexbildung zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten mit einem chemisch an einen unlöslichen Träger gebundenen und damit insolubilisierten Fibrinogen und Fibrinmonomer als Substrat arbeitet. Zum zweiten wird das Phänomen der Komplexbildung auf quantitativer Basis *in vitro* untersucht, um einen differenzier-

teren Einblick als bisher in die Beziehungen zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten zu erhalten. Dazu wurden neue Methoden der Spaltproduktherstellung und -isolierung entwickelt. Der letzte experimentelle Abschnitt befaßt sich mit der klinisch-diagnostischen Anwendung der entwickelten Methodik.

B. Theoretischer Teil: Biochemie des Fibrinogens und seiner Derivate

1. Fibrinogen

Fibrinogen liegt im Plasma in einer Konzentration von durchschnittlich 200 - 400 mg % vor. Die Fibrinogene der verschiedenen Säugetierspezies differieren in der Aminosäurezusammensetzung - soweit sie bekannt ist -, zeigen aber in den Molekülabschnitten, die funktionell von Bedeutung erscheinen, eine bemerkenswerte Übereinstimmung (SÖDERQVIST, BLOMBÄCK 1971). Die Molekulargewichte für die am häufigsten untersuchten Fibrinogene von Mensch und Rind sind nahezu identisch und wurden mittels physikochemischer Daten von CASPARY und KEKWICK (1957) für Humanfibrinogen mit 340.000 ± 10.000 (Sedimentationskonstante S^0_{W20} : 7,65 - 7,71; Diffusionskonstante D^0_{W20} : 1,98) und von SHULMAN (1953) für Rinderfibrinogen mit 330.000 ± 10.000 (Sedimentationskonstante S^0_{W20} : 7,80; Diffusionskonstante D^0_{W20} : 2,02) angegeben. Sie schwanken zwischen 325.000 (MOESSON et al. 1967) und 350.000 (BLOMBÄCK, LAURENT 1958) mit gelegentlichen Abweichungen nach oben (STEINER, LAKI 1952; JOHNSON, MIHALYI 1965a) und stimmen mit den Werten, die durch Addition der diskelektrophoretisch bestimmten Molekulargewichte der Fibrinogenuntereinheiten gewonnen wurden, überein (MCKEE et al. 1970; MCDONAGH et al. 1972b). Der isoelektrische Punkt des Fibrinogens liegt bei pH 5,5, der des Fibrins bei pH 5,6 (SEEGERs et al. 1945; MIHALYI 1950b; MIHALYI 1965).

Das Fibrinogenmolekül ist ein symmetrisch gebautes Dimer, das eine 6-Kettenstruktur besitzt, von denen je zwei Ketten identisch sind. Die drei Kettentypen werden mit ("A") α , (B) β und γ bezeichnet. "A" steht für Fibrinopeptid A und seine Varianten AP, AY und AYP; B für Fibrinopeptid B (BLOMBÄCK 1968a; IWANAGA et al. 1969). Fibrinogen hat demnach die Formel $[("A")\alpha, (B)\beta, \gamma]_2$, Fibrin die Formel $[\alpha, \beta, \gamma]_2$. Die einzelnen Ketten werden durch

Disulfidbrücken zusammengehalten und lassen sich nach Reduktion und Carboxymethylierung diskelektrophoretisch oder an CM-Cellulose trennen. Molekulargewichtsbestimmungen mittels Diskelektrophorese und Ultrazentrifuge ergeben folgende Werte: ("A") α -Kette 63.000 - 73.000; (B) β -Kette 56.000 - 60.000; γ -Kette 47.000 - 53.000. Die differierenden Molekulargewichte lassen sich teilweise durch Mikroheterogenitäten innerhalb der einzelnen Ketten erklären (MCKEE et al. 1966; MCKEE et al. 1970; MILLS, KARPATKIN 1970; GAFFNEY, DOBOS 1971; FURLAN, BECK 1972; MCDONAGH et al. 1972b).

Die N-terminalen Abschnitte der α - und β -Ketten werden durch die während des Gerinnungsvorganges durch Thrombin abspaltbaren Fibrinopeptide besetzt (Fibrinopeptid A IEP pH 3,2; Fibrinopeptid B IEP pH 3,1). Sie machen 3% des Gesamtgewichts des Fibrinogens aus (GLADNER 1968). Fibrinopeptid A (MG 1536) besitzt 16 Aminosäuren mit Alanin als N-terminaler Aminosäure; der mit AY (MG 1465) bezeichneten Variante fehlt das Alanin, an seiner Stelle erscheint die vorletzte Aminosäure Asparagin; bei Fibrinopeptid AP (MG 1616) ist die drittletzte Aminosäure Serin phosphoryliert; AYP stellt eine Kombination aus AY und AP dar. Die Molekulargewichte mittels Ultrazentrifugenmessungen liegen für "A" bei 2000 und für B bei 2400 (LAKI, GLADNER 1960). 10% - 20% von "A" werden durch den AY-, 20% - 30% vom AP-Typ repräsentiert, bis 70% von A. Fibrinopeptid B (MG 1552) setzt sich aus 14 Aminosäuren mit der N-endständigen Aminosäure Pyroglutamin zusammen. Die endständige Aminosäure der γ -Kette ist Tyrosin (BLOMBÄCK, YAMASHINA 1958; GLADNER 1960; BLOMBÄCK et al. 1963; BLOMBÄCK et al. 1965; BLOMBÄCK et al. 1966; LAKI, GLADNER 1968; BLOMBÄCK 1969; BLOMBÄCK et al. 1972).

(B) β - und γ -Kette eine Länge von 51, 115 und 78 Aminosäuren. Die Disulfidbrücken befinden sich innerhalb derselben Kette und verbinden die Ketten untereinander. Disulfidbrücken zwischen den Positionen 28-28 der beiden α -Ketten sowie zwischen den Positionen 8-8 und 9-9 der beiden γ -Ketten halten die korrespondierenden Dimeranteile des N-DSK zusammen (BLOMBÄCK et al. 1968a; IWANAGA et al. 1968; BLOMBÄCK 1969; HESSEL, BLOMBÄCK 1971; SÖDERQVIST 1971; BLOMBÄCK, BLOMBÄCK 1972; BLOMBÄCK et al. 1972; MURANO et al. 1972; BLOMBÄCK et al. 1973; BLOMBÄCK et al. 1974). Ein weiterer hydrophiler Disulfidknoten - Hi2-DSK - und drei hydrophobe Disulfidknoten - Ho1-DSK, Ho2-DSK und Ho3-DSK - entstammen dem mehr C-terminalen Fibrinogenanteil, wobei der Ho1-DSK eine monomere Struktur aus drei durch Disulfide zusammengehaltenen Ketten besitzt (MG 34.000) und der Ho2-DSK aus einer Kette (MG ca. 7.000) mit einer Cystinbrücke besteht (Abb. 1) (GARLUND et al. 1972a; GARLUND et al. 1972b; BLOMBÄCK et al. 1974).

Die β - und die γ -Kette enthalten einen Saccharidanteil; die γ -Kette ein Oligosaccharid von 10 - 12 Resten in Position 52 innerhalb des plasminresistenten Degradationsproduktes E; die β -Kette enthält den Zucker in Fragment D. der Zuckeranteil von insgesamt etwa 3% besteht aus Sialinsäure, Glukosamin, Galaktose und Mannose (BLOMBÄCK 1968; BLOMBÄCK et al. 1968a; HUSEBY, BANG 1971; GAFFNEY 1972a).

Natives Fibrinogen enthält neben ungeordneten Molekülabschnitten zu etwa 35% eine Helixstruktur. Eine zunehmende Molekülentfaltung tritt bei pH-Werten unter 5,5, über 10,0 und in neutralem Milieu bei Harnstoffkonzentrationen über 3 molar und Guanidinkonzentrationen über 1 molar auf. In bis zu 6 - 7 molarem Harnstoff beträgt die irreversible Denaturierung weniger als 5%; in 10 molaren Harnstoff- und 5 molaren Guanidinlösungen wird das Molekül total entfaltet (JOHNSON, MIHALYI 1965a; JOHNSON, MIHALYI 1965b; MIHALYI 1965; BLOMBÄCK 1967).

Aufgrund physikalischer und elektronenoptischer Befunde ist für das Fibrinogenmolekül eine Länge zwischen 880 Å und 375 Å angenommen worden, bei einem Achsenverhältnis von 1:20 bis 1:3, wobei eine Relation Breite zu Länge von 1:5 bis 1:7 am wahrscheinlichsten ist. Die Unterschiede finden ihre Erklärung in den differierenden Untersuchungsbedingungen wie Hydratationsgrad des Moleküls, pH, Ionenstärke des Milieus etc. (PORTER, HAWN 1949; STEINER, LAKI 1952; SHULMAN 1953; SCHERAGA, LASKOWSKI 1957; JOHNSON, MIHALYI 1965a; BANG 1967; MIHALYI 1968; MIHALYI 1971).

Zusammengefaßt existieren zur Zeit folgende Vorstellungen über die Struktur des Fibrinogens und Fibrins (Abb. 2 und Abb. 3):

Nach HALL und SLAYTER (1959) besteht das Molekül aus einem stabförmigen Gebilde von 475 ± 25 Å Länge und 15 Å Breite mit 2 kugeligen Proteinkonglomeraten von 65 Å an den Enden und einem von 50 Å in der Mitte. Bei Fibrinpolymerisation soll sich das Molekül auf 240 Å verkürzen und die im Elektronenmikroskop bei positiver Kontrastierung typische regelmäßige Querstreifung im Abstand von 230 - 240 Å mit einer interponierten schwächeren Bande zeigen.

KÖPPEL (1966, 1967, 1968, 1970) postuliert ein Pentagondodekaeder, dessen Kanten durch zwei Polypeptidstränge gebildet werden. Die Gebilde, die je nach Aufsicht einen etwas differierenden Durchmesser um 230 Å haben, können sich während des Polymerisationsvorgangs Kante an Kante, Fläche an Fläche oder Ecke auf Ecke aneinanderlagern, wobei nicht entschieden ist, ob ein Molekül aus einem oder mehreren Knoten besteht.

Von BANG (1967) wurde ein Molekül von 375 Å Länge und 65 Å Breite vorgeschlagen, das aus drei elliptischen Untereinheiten besteht. Polymere entstehen durch $1/3$ - und $2/3$ -Überlappung der einzelnen Moleküle, wodurch bei

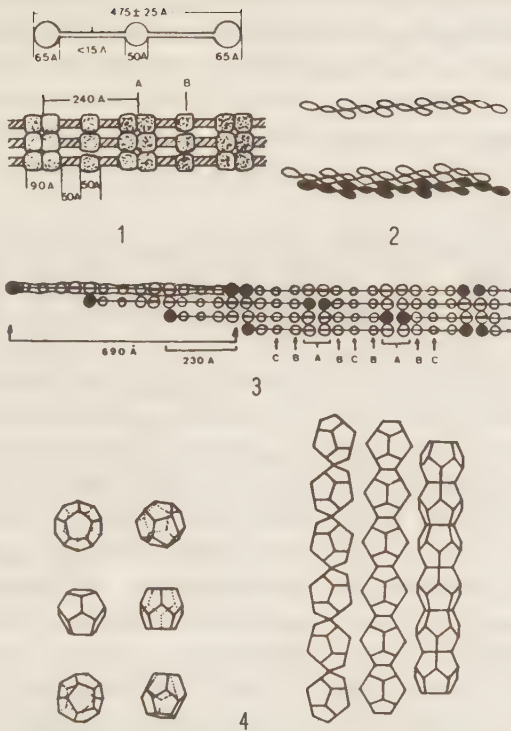


Abb. 2:

Modelle zum Fibrinogen und zur Fibrinpolymerisation.
 1. HALL und SLAYTER; 2. BANG; 3. KAY und CUDDIGAN;
 4. KÜPPEL (aus: POUIT et al. 1972)

Positivkontrastierung im elektronenoptischen Bild die bekannte Querstreifung von 230 Å mit interponierter feiner Bande im Fibrinnetz zustandekommt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Negativkontrastierung führten KAY und CUDDIGAN (1967) zu dem Schluß, daß das Molekül eine Länge von 690 Å mit einer Periodizität von 230 Å und einer Breite von ca. 30 Å

haben müsse. Die Fibrinpolymerisation erfolge über eine 1/3- und 2/3-Überlappung der Einzelmoleküle. Die 230 Å-Periodizität wird bei der Negativkontrastierung durch mehrere Banden repräsentiert, wobei sich die breite Bande bei Positivkontrastierung in drei negativ gefärbte auflöst und die schmale positive als breite negative imponiert (KARGES, KÜHN 1970).

Nachdem das HALL und SLAYTER - Modell lange im Vordergrund gestanden hat, ist es in letzter Zeit zugunsten des KÖPPEL-Modells relativiert worden. Abhängig von pH und Ionenstärke des Milieus haben sich neben faserartigen auch sphärische Formen des Fibrinogens und Fibrins darstellen lassen, die sich zum Teil nach Milieuänderung und Behandlung mit bestimmten Agentien ineinander transformieren lassen (COHEN et al. 1966; GOLLWITZER et al. 1970; BELITSER et al. 1973). Nach POUIT et al. (1972) entsteht die Fibrinfaser durch Zusammenlagerung kugelliger Moleküle mit nachfolgender Kontraktion der Kugeln auf einen Abstand von 230 Å voneinander und Ausbildung faserförmiger Verbindungen. Insbesondere lassen sich Fibrinfasern ohne Querstreifung induzieren, deren Fibrillendicke nicht mit der von HALL und SLAYTER übereinstimmt (KAY, CUDDIGAN 1967; GOLLWITZER et al. 1970; BELITSER et al. 1971; BELITSER et al. 1973). Untersuchungen von LEDERER (1972) mittels Röntgenbeugung stützen die Vorstellungen KÖPPELS.

BELITSER et al. (1973) beschreiben das Fibrinogenmolekül als aus zahlreichen stabartigen Proteinteilen bestehend, die gelenkig miteinander verbunden einen sphärischen Körper bilden und sich entweder durch Milieuänderung oder bei Umwandlung zu Fibrin longitudinal entfalten. Die Fibrinpolymerisation wird in Anlehnung an KAY und CUDDIGAN (1967) interpretiert, wobei die breiten Banden bei Negativkontrastierung der Lage der N-terminalen Regionen der beiden Hälften des Moleküls entspre-

chen sollen, denen die C-terminalen Molekülteile als korrespondierende Bindungspartner gegenüberstehen (Abb. 3).

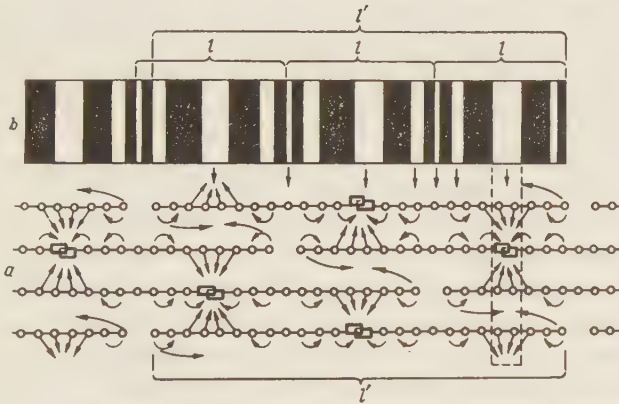


Abb. 3:

Fibrinogen- und Polymerisationsmodell nach BELITSER et al. (1973).
Kästchen: N-terminale Anteile der Fibrinogenuntereinheiten; Pfeile: Polymerisationszentren und Richtung der intramolekularen Proteinverschiebungen; l' Moleküllänge; l Periodenlänge

Zur Präparation von Fibrinogen sind zahlreiche Methoden angegeben worden. Bei langsamem Auftauen von Plasma bei $+5^{\circ}\text{C}$ geht Fibrinogen verzögert in Lösung und lässt sich isolieren (WARE et al. 1947). Üblicher sind nach Adsorption von Prothrombin mit Barium- bzw. Magnesiumsulfat wiederholte Fällungen des Fibrinogens mit konzentrierten Aminosäurelösungen wie 2 M β -Alanin (STRAUGHN, WAGNER 1966) und 2,2 M Glycin (KAZAL et al. 1963; WALKER, CATLIN 1971). Die weiteste Verbreitung hat das für Human- und Rinderfibrinogen in gleicher Weise verwendbare Reinigungsverfahren von BLOMBÄCK und BLOMBÄCK gefunden. Es

geht von der Fraktion I der Methode 6 von COHN et al. (1946) aus und schließt kombinierte Äthanol-Glycinfällungen an. KEKWICK et al. (1956) benutzen Äther als organisches Fällungsmittel.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde nach BLOMBÄCK und KEKWICK gereinigtes Fibrinogen verwendet. Die Fibrinogenpräparationen sind gering kontaminiert mit Faktor VIII, Plasminogen und Faktor XIII. Zur Entfernung von Plasminogen wird Adsorption an Kohle (MAXWELL 1968), Chromatographie über Sephadex G 200 (BERG, KORSAN-BENGTSSEN 1963) oder an DEAE-Cellulose (FINLAYSON 1968) empfohlen. Durch zusätzliche Fällungen des Fibrinogens mit einem Gemisch von 0,1 M Lysin bzw. 0,1 M EACA und 7%igem Äthanol (MOSESSON 1962), das die Löslichkeit des Plasminogens erhöht und es damit aus dem Fibrinogenpräzipitat entfernt, und durch Affinitätschromatographie z.B. an Sepharose-Butesin (ZOLTON, MERTZ 1972) sind Plasminogen-freie Chargen zu präparieren. Fibrinogen ohne Faktor XIII-Aktivität wird erhalten durch Kohle-adsorption (MAXWELL 1968), Chromatographie des Fibrinogens an DEAE-Cellulose (MOSESSON, FINLAYSON 1963), Behandlung mit 3,3 M Harnstoff (SCHWARTZ et al. 1970; SCHWARTZ et al. 1971b) und Blockade der SH-Gruppen des Faktors XIII durch Parachloromercuribenzoat (SWIGERT et al. 1963; SCHWARTZ et al. 1971b).

Innerhalb der Fibrinogenpräparationen existieren Heterogenitäten infolge von Ladungsunterschieden, die im Auftreten von zwei Komponenten bei Chromatographie an DEAE-Cellulose in einer Relation von 85% (Peak 1) und 15% (Peak 2) zum Ausdruck kommen. Beide Fibrinogenvarianten verhalten sich außer ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit völlig gleich. Der Unterschied besteht in einer Modifikation von ca. 50% der γ -Kette des Peak 2 Fibrinogens mit demnach folgender Formel: $(\text{"A"}\alpha)_2(\text{B}\beta)_2\gamma\gamma'$ (FINLAYSON, MOSESSON 1963; MOSESSON

et al. 1972b). Außerdem ließen sich Fibrinogene höherer Löslichkeit isolieren, die erst bei höheren Äthanolkonzentrationen als üblich (bei 16% statt 8%) fällbar sind. Sie weisen eine gleiche Gerinnbarkeit, aber eine verzögerte Polymerisation und eine verminderte Stabilisierung durch Faktor XIII auf. Es handelt sich um in vivo entstehende frühe fibrinogenolytische Abbauprodukte mit beginnender Degradation der α -Kette vom C-terminalen Ende her (MOSESSON, SHERRY 1966; MOSESSON et al. 1967; SHERMAN et al. 1969a; SHERMAN et al. 1969b; FINLAYSON et al. 1972; MOSESSON et al. 1972a).

2. Gerinnung

Die Umwandlung von Fibrinogen (FG) zu Fibrinmonomer (FM) und der Weg zum endgültigen Gerinnsel ist ein Prozeß enzymatischer und physikalischer Vorgänge, der sich in mehrere Stufen gliedern läßt. Am Anfang steht die proteolytische Abspaltung der Fibrinopeptide (Fp A + B), die gefolgt ist von der nicht Enzym-katalysierten Polymerisation der Fibrinmonomere (FM) über Intermediärpolymere (FM_n) zum löslichen Gerinnsel (Fibrin-Gel_s). Die kovalente, wiederum enzymatisch gesteuerte Quervernetzung des Fibringels durch den Faktor XIII bildet den abschließenden Schritt (Fibrin-Gel_i) (Abb. 4).

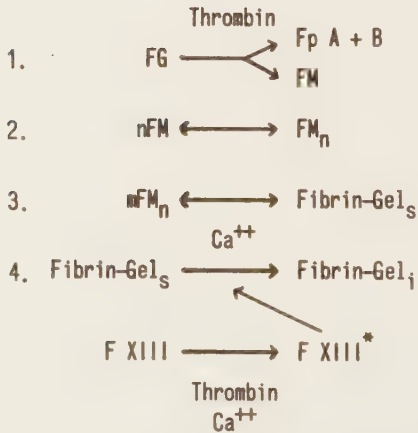


Abb. 4:

Fibrinogen-Fibrinkonversion

Thrombin (EC 3.4.4.13; MG 21.000 - 23.000), das Enzym der Fibrinogenaktivierung, ist verwandt dem Plasmin (EC 3.4.4.14), dem Trypsin (EC 3.4.4.4) und Chymotrypsin (EC 3.4.4.5), die zur Spaltung von Arginyl- und/oder Lysylbindungen befähigt sind. Es besitzt neben der proteolytischen Wirkung (Thrombin-C) eine esterolytische Aktivität (Thrombin-E), die sich bevorzugt in der Spaltung bestimmter, an der α -Aminogruppe substituierter Aminosäureacyltester wie Tosylargininmethylester (TAME) nachweisen und messen läßt. Beide Aktivitäten werden durch Blockade des im aktiven Zentrum des Enzyms befindlichen Serinrestes durch Diisopropylfluorphosphat (DFP) inhibiert, während Acetylierung nur die proteolytische Komponente hemmt und die esteratische unbeeinflusst läßt. TAME hat einen kompetitiv-inhibierenden Effekt auf die Thrombin-C-Eigenschaft des Enzyms (SHERRY, TROLL 1954; LAKI, GLADNER 1960; LORAND 1965).

Thrombin arbeitet nach dem Prinzip der Substratstruktur bedingten limitierten Proteolyse, indem es im nativen Fibrinogenmolekül durch Spaltung von 4 Arginyl-Glycin-Bindungen in Stellung 16-17 der α -Ketten und Stellung 14-15 der β -Ketten die Fibrinopeptide "A" und B liberiert; damit werden neben den beiden Tyrosin-Resten der γ -Ketten vier Glycin-Reste N-terminal endständig. Durch hohe Thrombinkonzentrationen läßt sich zusätzlich durch Spaltung der Arg 19 - Val 20 Bindung ein Tripeptid (Gly-Pro-Arg) aus der α -Kette freisetzen. Die Thrombinsuszeptibilität ist nicht an den nativen Zustand des Substrats gebunden. Fibrinopeptide "A" und B lassen sich auch aus den Fibrinogenspaltprodukten, aus dem nach dem Isolierungsprozeß denaturierten N-DSK, sowie aus den einzelnen Ketten nach Reduktion und Trennung des N-DSK, des Plasminhydrolysats oder des Gesamtmoleküls liberieren (WALLEN, BERGSTRÖM 1958; BLOMBÄCK et al. 1968a; BLOMBÄCK et al. 1968b; IWANAGA 1969; WALLEN 1971; BLOMBÄCK et al. 1972; WOODS et al. 1972). In der denaturierten α - und β -Kette werden

einige zusätzliche Thrombin-sensible Bindungen freigelegt; die Potenz des Thrombins erreicht aber bei weitem nicht die des Trypsins, das im humanen Fibrinogen nach Sulfitolyse rund 260 - 300 Bindungen und die des Plasmins, das unter gleichen Bedingungen etwa 160 - 170 Bindungen spaltet (WALLEN 1971). Reptilase (MG ca. 40.000) und Arvin (MG ca. 30.000), die im nativen Fibrinogen ausschließlich Fibrinopeptid "A" freisetzen, haben im N-DSK einen zusätzlichen Angriffspunkt bei Arg 19 - Val 20 (Reptilase) und Arg 23 - His 24 (Arvin) der α -Kette und setzen aus dem N-DSK bzw. dessen β -Kette Fibrinopeptid B und ein weiteres Bruchstück frei (HESSEL, BLOMBÄCK 1971).

Die Fibrinopeptide haben einen Thrombin-inhibierenden Effekt (GORMAN, CASTALDI 1973), Fibrinopeptid B darüber hinaus eine die Erregbarkeit des Muskels steigernde Eigenschaft (LAKI 1951a). Die während des Gerinnungsprozesses durch Thrombin bedingte Abspaltung von Fibrinopeptid "A" erfolgt schneller als die Fibrinopeptid B - Freisetzung (BLOMBÄCK, VESTERMARK 1958; SHAINOFF, PAGE 1962; BLOMBÄCK 1967). Nachdem etwa 10 - 15% des verfügbaren Fibrinopeptid "A" abgespalten sind, setzt der Polymerisationsprozeß ein, der nicht an den Fibrinopeptid B - Verlust des Moleküls gebunden ist. Es ist ein Enzym aus dem Gift der Schlange *Ancistrodon contortrix contortrix* isoliert worden, das zu einer bevorzugten Fibrinopeptid B - Abspaltung mit zeitlich nachhinkender Fibrinopeptid "A" - Abspaltung führt. Die Polymerisation der Fibrinmonomere beginnt wiederum erst, nachdem ca. 1/6 des Fibrinopeptid "A" entfernt ist, zu einem Zeitpunkt, an dem schon 80 - 90% Fibrinopeptid B fehlen (HERZIG et al. 1970).

Der Polymerisationsvorgang läßt sich in der Weise interpretieren, daß durch Fibrinopeptid "A" - Abspaltung und Konfigurationsänderung des Moleküls ein Polymerisationszentrum I offengelegt (Gerinnung durch Reptilase) und zusätzlich der enzymatische Angriff auf das Fibrinopeptid B freigegeben wird. Nach einer weiteren Konformations-

Änderung entsteht dann ein Polymerisationszentrum II (BLOMBÄCK 1969a; BLOMBÄCK 1969b; BLOMBÄCK 1971; BLOMBÄCK 1972). Der Beginn der Polymerisation nach Fibrinopeptid "A" - Verlust wird in den Bereich der γ -Ketten lokalisiert, in dem auch die Faktor XIII-katalysierte Quervernetzung der γ -Ketten zu γ -Dimeren einsetzt, welche der α -Ketten-Polymerisation vorausgeht (MCDONAGH et al. 1971; DOOLITTLE et al. 1972). Im Fibrinogen Detroit, in dem die basische Aminosäure Arginin in Stellung 19 der α -Kette nahe dem Angriffspunkt des Enzyms durch das neutrale Serin ersetzt ist, erfolgt die Fibrinopeptid A - Abspaltung; die nachfolgende Konformationsänderung bleibt wahrscheinlich aus, da die Fibrinopeptid B - Freisetzung wie die Polymerisation weitgehend verhindert ist (BLOMBÄCK et al. 1968; BLOMBÄCK, BLOMBÄCK 1972). Die Fibrinopeptid "A" - Abspaltung läßt eine End-zu-End-Polymerisation zu; der zusätzliche Verlust von Fibrinopeptid B eröffnet die Möglichkeit, die Fibrinmonomere Seit zu Seit zu aggregieren (STEINER, LAKI 1952; BLOMBÄCK, LAURENT 1958; LAURENT, BLOMBÄCK 1958). Während die Thrombineinwirkung ihr Optimum bei pH 8 hat, erfolgen Polymerisation und Gerinnselbildung am günstigsten bei einem pH von 6,4 (BLOMBÄCK, LAURENT 1958; BLOMBÄCK 1967). Der Verlauf der Polymerisation ist milieuabhängig; End-zu-End-Aggregation wird begünstigt bei pH 6,35, Seit-zu-Seit-Anlagerung bei pH 9,0 (BLOMBÄCK, LAURENT 1958; LAURENT, BLOMBÄCK 1958).

Die von Thrombin unabhängigen Phasen der Fibrinpolymerisation (Stufe 2 und Stufe 3 der Gerinnung) lassen sich in geeigneten Systemen, die 0,5 M Hexamethylenglycol, 0,5 M Lithiumbromid, 1 M Harnstoff bzw. 1 M Natriumbromid enthalten, mit physikalischen Verfahren verfolgen. In einer 1 molaren gepufferten Natriumbromidlösung pH 5,3 ist Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin überführbar, ohne daß eine Assoziation der Monomere erfolgt (LAKI 1951b; DONNELLY et al. 1955; SHERAGA, LASKOWSKI 1957). Verschiebung des pH nach 6,0 und darüber führt

zu einer Vielzahl von intermediären Polymeren unterschiedlicher Größe, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Im Bereich der angegebenen Bedingungen erreichen die Intermediate eine Länge von 3000 - 6000 Å bei der Breite von 2 Fibrinmolekülen, entsprechend etwa 15 - 20 parallel in Doppelreihe einander überlappenden Fibrinmolekülen. Bei pH 6,3 findet der Übergang zu Schritt 3, zur Bildung der dreidimensionalen Gelformation statt. Schritt 2 und Schritt 3 sind voll reversibel; das Fibringel und der monodisperse Zustand lassen sich unter gegebenen Bedingungen durch pH-Verschiebungen zwischen 6,3 und 5,3 wechselseitig ineinander überführen. Verdünnung der Fibrinlösung verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Monodispersität, Konzentrationserhöhung bewirkt das Gegenteil. Die End-zu-End - Verbindungen sind weniger fest als die sich später bildenden Seit-zu-Seit - Verbindungen (FERRY 1952; STEINER, LAKE 1952; DONNELLY et al. 1955; SHERAGA, LASKOWSKI 1957; LAKE, GLADNER 1964; BLOMBÄCK 1967). Neben elektrostatischer Anziehung (Dipol), Assoziation nicht polarer Gruppen im Molekül scheinen überwiegend Wasserstoffbrücken für die Longitudinal- und Lateralpolymerisation verantwortlich zu sein (FERRY 1952; DONNELLY et al. 1955; SHERAGA, LASKOWSKI 1957; LAKE, GLADNER 1964). Dafür spricht, daß in pH - Bereichen unter 5 und über 10 auf Grund der Ionisierung der verantwortlichen Gruppen keine Gerinnung mehr erfolgt, und Wasserstoffbrücken sprengende Agentien wie Harnstoff, Natriumbromid und Guanidin ein nicht stabilisiertes Fibringel solubilisieren.

Verantwortlich für die Bindungen scheinen als Donatoren die ε-Aminogruppen des Lysins und die Hydroxylgruppe des Tyrosins zu sein, als Akzeptor Histidin, wobei vermutet wird, daß der Akzeptor im Fibrinogenmolekül frei zugänglich ist, während die Donatoren durch Fibrinopeptidabspaltung freigelegt werden. Dies würde die noch später zu besprechende Komplexbildung zwischen Fibrin-

monomer und Fibrinogen ermöglichen können. DOOLITTLE et al. (1972) haben ein Strukturmodell konzipiert, das die räumlichen Voraussetzungen für zwei Transpeptidierungsreaktionen des fibrinstabilisierenden Faktors (Faktor XIII) jeweils zwischen den vom Aminoende des Bruchstücks nach gezählten Stellungen 7 (Glutamin) und 15 (Lysin) der C-terminalen Anteile der antiparallel verlaufenden Ketten zweier Fibrinmoleküle schafft. In diesem Modell stehen sich zwei Glutaminreste in Stellung 8 und 16 bzw. umgekehrt und zwei Leucinreste in Stellung 11 gegenüber, die Wasserstoffbindungen bzw. eine hydrophobe Interaktion zwischen zwei γ -Ketten und damit nach den Vorstellungen der Autoren eine initiale End-zu-End - Polymerisation ermöglichen würden. An der nachfolgenden Assoziation der Intermediärpolymere sollen die α -Ketten maßgeblich beteiligt sein. Die Beobachtung, daß bei Fibrinolyse mit Verlust der Quervernetzbarkeit der γ -Ketten die Gerinnbarkeit schwindet, ließe sich als Stütze dieser These anführen (GAFFNEY, DOBOS 1971). Für die Beteiligung von Wasserstoffbrücken spricht, daß durch Blockade der Hydroxylgruppen des Tyrosins (DOOLITTLE et al. 1972) und Acetylierung der ϵ -Aminogruppen (WEGRZYNOWICZ et al. 1973, 1974) die Gerinnung zu inhibieren ist. Derivatbildung an der ϵ -Aminogruppe des Lysins durch Succinylierung (GLADNER 1968) bzw. Maleinisierung (KLOCZEWIAK et al. 1974) führt infolge Ladungsänderung durch Ersatz der basischen Aminogruppen durch die im alkalischen pH ionisierten Carboxylgruppen und infolge Konformationsänderung durch Reduktion des helicalen Anteils des Moleküls von 34% auf 25% bei maximaler Succinylierung zur völligen Verhinderung der Polymerisation.

Den letzten Schritt im Ablauf der plasmatischen Gerinnung stellt die Stabilisierung des löslichen zum unlöslichen Gerinnsel durch die enzymatische Transamidierungsreaktion des Gerinnungsfaktors XIII dar (LORAND-LAKI-Faktor, Transamidase, Transpeptidase, fibrinstabilisie-

render Faktor, Fibrinase). In den Jahren nach einer der ersten Beschreibungen durch LAKI und LORAND (1948) konnte das Enzym isoliert und in seinen Eigenschaften charakterisiert werden (LOEWY et al. 1961a; LOEWY et al. 1961b). Faktor XIII des Plasmas hat ein Molekulargewicht von 320.000 und besteht aus den Untereinheiten a und b mit einem Molekulargewicht von jeweils 81.000; jede Untereinheit ist zweifach vertreten. (Plättchenfaktor XIII besteht aus zwei a-Einheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 145.000.) Bei Aktivierung des Proenzyms nach dem Prinzip der limitierten Proteolyse durch Thrombin in Anwesenheit von Kalziumionen vermindert sich das Molekulargewicht der a-Kette auf 77.000 (SCHWARTZ et al. 1971a; LOEWY 1972; MCKEE et al. 1972). Reptilase, ein Serin-Enzym wie Thrombin, ist ebenfalls in der Lage, Faktor XIII zu aktivieren, Arvin dagegen so gut wie nicht (BLOMBÄCK 1972). Aktiver Faktor XIII stellt - ebenfalls in Abhängigkeit von Kalziumionen - durch nucleophilen Angriff der ϵ -Aminogruppe von Lysin als Donor auf die γ -Position von Glutamin als Akzeptor unter Austritt einer Aminogruppe kovalente Bindungen zwischen den Ketten her (PISANO et al. 1968; DOOLITTLE et al. 1972). Pro Mol Fibrin können 6 Mol ϵ -(γ -glutamyl)-Lysin-Bindungen gebildet werden (PISANO et al. 1971; FINLAYSON et al. 1972; PISANO et al. 1972). Mindestens zwei Bindungsstellen finden sich am C-terminalen Ende zweier antiparallel verlaufender γ -Ketten zwischen Glu 7 und Lys 15. Nach Ketten-trennung durch Reduktion des Fibringerinnsels und disk-elektrophoretischer Analyse läßt sich ein γ - γ Dimer mit einem Molekulargewicht von 105.000 - 110.000 identifizieren, dem doppelten Gewicht einer γ -Einzelkette (MCKEE et al. 1970; MCDONAGH et al. 1971; TAKAGI, IWANAGA 1971; DOOLITTLE et al. 1972; MCKEE et al. 1972).

Es wurde angenommen, daß die γ -Dimerisation intramolekular abläuft (MCDONAGH et al. 1972a). Der Beweis für die intermolekulare Quervernetzung der γ -Ketten wurde

Durch Hybridisierung von Rinder- und Humanfibrinogen
erbracht. Es ließ sich ein γ - γ Dimer isolieren, das
aus den C-terminalen Ketten beider Spezies bestand, die
an ihrer Aminosäurezusammensetzung gering differieren:
Pos. 2: human Threonin, bovin Alanin; Pos. 10: human
Histidin, bovin Glutamin (DOOLITTLE et al. 1971).

Die restlichen vier ϵ -(γ -glutamyl)-Lysin-Bindungen
finden sich innerhalb der α -Kette und bilden ein in-
tramolekulares α -Polymer. Die Kettenlänge entspricht
mindestens einem Molekulargewicht von 400.000 - 800.000,
da ein Eintritt des α -Polymers in das Gel bei disktelek-
trophoretischer Trennung nicht erfolgt (MCKEE et al.
1970; MCDONAGH et al. 1972a). Ein Teil der reaktiven
Stellen liegt im Bereich des C-terminalen Endes der
 α -Kette, da die Anzahl der Brücken bei Fibrin aus Fi-
brinogen höherer Löslichkeit, das ein frühes Degrada-
tionsprodukt mit ausschließlicher Reduktion der α -Kette
am C-Terminus darstellt, von 6 auf 2 bis 3 abnimmt. Da
dennoch α -Polymere, allerdings in geringerer Menge,
auftreten, scheinen Vernetzungsmöglichkeiten auch im
N-terminalen Bereich möglich zu sein (FINLAYSON et al.
1972; FINLAYSON, MOESSON 1973).

Unter geeigneten Bedingungen tritt die Vernetzung der
 γ -Ketten innerhalb kürzester Zeit ein (ca. 15 Min.),
während die Polymerisation der α -Ketten erheblich ver-
zögerter vonstatten geht (2 - 16 Std.) (MCKEE et al.
1970; SCHWARTZ et al. 1971b; MCDONAGH et al. 1972a).
Irreversibilität der Gerinnselbildung ist erst bei etwa
100%iger γ - γ Dimerisation erreicht, β -Ketten sind in
den Prozeß der Quervernetzung nicht involviert (MCDONAGH
et al. 1972a). Irreversible Faktor XIII - katalysierte
Bindungen sind ebenfalls zwischen Fibrinogen und Fibrin-
monomer möglich, auch wenn nur Fibrinopeptid A fehlt
(LORAND, JACOBSEN 1965; SASAKI et al. 1966; CHEN, DOO-
LITTLE 1969; MCDONAGH et al. 1972a).

Zahlreiche Inhibitoren der Fibrinstabilisierung sind angegeben worden, die die reversible Fibrinpolymerisation nicht beeinträchtigen, aber die Bindungsstellen für die irreversible Polymerisation im Fibrin blockieren. Als Prototyp des Inhibitors vom Donator-Typ kann Glycin-äthylester (GEE) gelten, das im nucleophilen Angriff anstelle des Lysins in das Glutamin eingeführt wird. In elektrophiler Reaktion vertritt Carbobenzoxo-L-Asparaginsäure als Carbonyl enthaltendes Molekül Glutamin und wird in Lysin inkorporiert (LORAND, JACOBSEN 1964; LORAND, JACOBSEN 1965; LORAND, ONG 1966; LORAND et al. 1968; LORAND et al. 1972; NILSSON et al. 1972).

3. Fibrino(-geno-)lyse

Plasmin (EC 3.4.4.14) mit einem Molekulargewicht von 49.000 ist eine Endopeptidase und spaltet wie Trypsin (EC 3.4.4.4) Arginin- und Lysinbindungen (BANG 1971; LATALLO et al. 1971; WALLEN 1971). Im Fibrinogenmolekül (vom Rind) finden sich etwa 220 - 230 Lysinbindungen und 150 Argininbindungen, zusammengenommen also etwa 370 potentiell spaltbare Bindungen (HUSEBY, BANG 1971). Trypsin entfaltet eine größere proteolytische Fähigkeit als Plasmin. Im nach Sulfitolyse in seine Ketten zerlegten und denaturierten Fibrinogen werden durch Plasmin 150 - 170, durch Trypsin dagegen um 260 - 300 Arginin- und Lysinbindungen hydrolysiert; das bedeutet im ersten Fall, daß ca. 50%, im zweiten Fall etwa 75% der theoretisch möglichen Angriffsorte proteolysiert werden (WALLEN, BERGSTRÖM 1958; WALLEN 1971). Zahlreiche Trypsin-sensible Bindungen sind Plasmin gegenüber resistent; der umgekehrte Fall scheint nicht vorzukommen. Im nativen Fibrinogenmolekül sind durch die räumliche Struktur des Proteins bedingt zahlreiche Bindungen dem Zugriff der enzymatischen Spaltung entzogen (WALLEN 1971).

Im Verlauf der durch Plasmin bedingten Fibrino(-geno-)lyse entstehen über weitgehend definierte Zwischenstufen hochmolekulare, plasminresistente, nicht mehr gerinnbare Lyseendprodukte. Die erste eingehende analytische Studie über die im Endstadium der Fibrinogenolyse und Fibrinolysen entstehenden Produkte wurde von NUSSENZWEIG et al. durchgeführt (NUSSENZWEIG, SELIGMANN 1960; NUSSENZWEIG et al. 1961a; NUSSENZWEIG et al. 1961b). Neben niedermolekularen Spaltprodukten A, B und C wurden mit D und E bezeichnete Fragmente hohen Molekulargewichts identifiziert, die dem " α -Derivat" und " β -Derivat" von SEEGERs et al. (1945) und den beiden elektrophoretisch trennbaren, hitzelabilen und hitzestabilen Fragmenten des sogenannten "AFIF" (anticoagulant fraction of incubated fibrinogen) von TRIANTAPHYLLOPOULOS entsprechen (TRIANTA-

PHYLLOPOULOS 1958; TRIANTAPHYLLOPOULOS 1960; TRIANTAPHYLLOPOULOS, TRIANTAPHYLLOPOULOS 1962). In den folgenden Jahren wurde erkannt, daß die Fibrinogenolyse einen kontinuierlich über mehrere Zwischenprodukte abnehmenden Molekulargewichts ablaufenden Prozeß darstellt, der in den erwähnten Endprodukten zum Stillstand kommt. Die Intermediärprodukte wurden mit X und Y bezeichnet und mit den finalen Proteinen D und E eingehend analysiert (LARRIEU et al. 1966; MARDER et al. 1967; MARDER et al. 1969a; MARDER, SHULMAN 1969; MARDER 1971) (Abb. 5; Abb. 6).

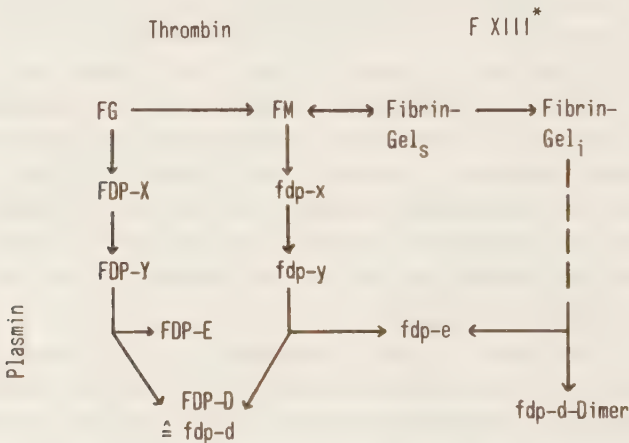


Abb. 5:

Lyse von Fibrinogen und Fibrin durch Plasmin
(modifiziert nach HEENE 1969)

Hauptsächlich unter dem Aspekt des Einflusses auf den Gerinnungsvorgang wurde die Fibrinogenolyse von MARDER et al. in ein Stadium 1: Anfangsphase der Lyse mit FDP-X als dominierender Komponente, ein Stadium 2: Vorhandensein der Intermediäre FDP-X und FDP-Y, zusätzlich in geringerem Maße FDP-D und FDP-E, und in ein Stadium 3 un-

terteilt, das nur noch die Lyseendprodukte enthält (MARDER et al. 1967; MARDER et al. 1969a; MARDER 1971). Analog zu interpretieren ist die Klasseneinteilung der Spaltprodukte in "first fibrinogen derivative", "intermediate derivatives" und "final fibrinogen derivatives" (FLETCHER et al. 1966; FISHER et al. 1967) bzw. in "early" und "late fibrinogen degradation products" (LATALLO et al. 1964; NIEWIAROWSKI et al. 1970).

Nach dem von LARRIEU et al. und MARDER et al. vorgeschlagenen Abbauschema wird Fibrinogen (MG 330.000) durch Abspaltung von Peptiden in das Derivat FDP-X mit einem Molekulargewicht von 240.000 - 270.000 umgewandelt (LARRIEU et al. 1966; MARDER et al. 1967; MARDER et al. 1969a; MARDER, SHULMAN 1969; MARDER 1971). X besitzt eine wenn auch verzögerte Gerinnbarkeit. FDP-X wird im weiteren Verlauf der Lyse gespalten in Fragment FDP-Y (MG 155.000) und Fragment FDP-D (MG 83.000 - 85.000; hitzelabil, IEP 5,5; SEEGERs et al. 1945). FDP-Y wird lysiert zu einem weiteren Fragment FDP-D und Fragment FDP-E (MG 50.000; hitzestabil, IEP 4,2; SEEGERs et al. 1945). Am Ende der Lyse liegen pro Molekül Fibrinogen zwei Moleküle D und ein Molekül E vor, die zusammen ca. 70% des Gewichts des Fibrinogenmoleküls ausmachen, wobei 50 - 55% durch D und 15 - 20% durch E repräsentiert werden; 30% entfallen auf niedermolekulare Peptide vorzugsweise aus dem Bereich der α -Kette des Fibrinogenmoleküls (NUSSENZWEIG et al. 1961a; FLETCHER et al. 1966; BUDZYNSKI et al. 1967; KOWALSKI 1968).

Die Fragmente Y, D und E sind durch Thrombin nicht gerinnbar. Spaltprodukt E umfaßt den N-terminalen Anteil des Fibrinogenmoleküls und ist partiell identisch mit dem sogenannten N-terminalen Disulfidknoten (N-DSK) (MARDER et al. 1972; KOWALSKA-LOTH et al. 1973). Die beiden Fragmente D entsprechen den C-terminalen Abschnitten des Moleküls (PIZZO et al. 1972a; DUDEK-WOJCIECHOWSKA et al. 1973a; KLOCZEWIAK et al. 1973).

Es wird angenommen, daß die Fragmente D und E nicht kovalent über hydrophobe Bindungen in Form eines Komplexes im Endlysat vorliegen und auch spontan zu Komplexen assoziieren können (BUDZYNSKI et al. 1967; GAFFNEY, DOBOS 1971; PLOW, EDGINGTON 1972; PLOW, EDGINGTON 1974). Die Konformation der Fragmente im Komplex scheint dem sterischen Bezug im Fibrinogenmolekül zu entsprechen, da u.a. die antigene Expression des Komplexes größer ist als die der Summe der einzelnen Fragmente (PLOW, EDGINGTON 1972).

Im Verlauf der Lyse geht ein Teil der Determinanten des Fibrinogens verloren. FDP-X und FDP-Y enthalten gemeinsame Determinanten, allerdings in geringerer Zahl als Fibrinogen; FDP-D und FDP-E haben keine gemeinsamen antigenen Determinanten; ihre Zahl ist gegenüber den größeren Bruchstücken weiter reduziert. Die kleinen Bruchstücke A, B und C zeigen keine Reaktion mit Antifibrinogen (NUSSENZWEIG, SELIGMANN 1960; NUSSENZWEIG et al. 1961b; MARDER 1968; MARDER et al. 1969a). Während der Fibrinogenolyse tritt beim Übergang zu FDP-X ein vorher maskiertes sogenanntes Neoantigen im D-Bereich des Moleküls auf, das in den Fragmenten X, Y und D nachweisbar ist (PLOW, EDGINGTON 1973).

Die Spaltprodukte des löslichen Fibrins unterscheiden sich in ihrer Struktur und ihrem Molekulargewicht prinzipiell nicht von denen des Fibrinogens (DUDEK et al. 1970; NIEWIAROWSKI, NANDI 1971). Aus einem der Lyse unterworfenen Gerinnsel treten neben geringen Mengen X und Y hauptsächlich erst die Endprodukte D und E in den Überstand, da die größeren Fragmente im Fibrinverband gehalten werden (NIEWIAROWSKI et al. 1970; EKERT, MUNTZ 1972; GAFFNEY 1973). Die Fibrinolyse verläuft langsamer als die Fibrinogenolyse; insbesondere ist stabilisiertes Fibrin auf Grund seiner kovalenten Quervernetzung Plasminder resistenter und einer verzögert ablaufenden Lyse unterworfen (GORMSEN, FEDDERSEN 1972; GAFFNEY, BRASHER 1973b). Die Quervernetzungsstellen im Bereich der C-ter-

minalen Enden der α -Ketten werden als kleinmolekulare quervernetzte Fragmente liberiert (GAFFNEY, BRASHER 1973b; PIZZO et al. 1973a); in den Gerinnselüberstand treten ausschließlich die Lyseendprodukte, da alle Intermediärstufen im Fibrinnetz gehalten werden. Die Fragmente d, in deren Bereich zwischen den einzelnen Fibrinmolekülen die durch Faktor XIII bedingte Stabilisierung erfolgt, treten als d-Dimere mit einem Molekulargewicht von 164.000 auf, da die ϵ -(γ -glutamyl)-Lysin-Bindungen nicht plasmin-empfindlich sind (GAFFNEY 1973; GAFFNEY, BRASHER 1973b; KOPEC et al. 1973) (Abb. 5).

Nicht quervernetzte, durch Reptilase und Arvin induzierte Gerinnsel sind einer schnelleren Lyse unterworfen als solche nach Thrombineinwirkung. Abgesehen davon, daß Arvin (Ancrod) proteolytisch auf die α -Kette wirken soll, wird dieser Effekt dadurch erklärt, daß die plasminsensiblen Bindungen in Gerinnseln, die aufgrund ausschließlicher Fibrinopeptid "A" - Abspaltung und End-zu-End - Polymerisation entstanden sind, dem Angriff des Enzyms zugänglicher sind als Thrombin-induzierte Gerinnsel mit End-zu-End - und Seit-zu-Seit - Polymerisation (KOPEC et al. 1972; KWAAN et al. 1973). In vitro läßt sich ebenfalls nach Arvin (Ancrod) - Gabe eine beschleunigte Fibrindegradation feststellen (SILBERMAN et al. 1973).

Bei den mit X, Y, D und E bezeichneten Fragmenten handelt es sich nicht um exakt charakterisierbare Moleküle, sondern um Molekülfamilien, deren Mitglieder in ihrer Größe bestimmte Differenzen aufweisen. Der proteolytische Fibrinogenabbau läuft über zahlreiche Stufen ab. Fragment X mit einem Molekulargewicht zwischen 270.000 und 240.000 und Fragment Y sind heterogen entsprechend dem Degradationsgrad der einzelnen Ketten. Fragment X weist mindestens vier Varianten auf (FURLAN, BECK 1972; PIZZO et al. 1972a; PIZZO et al. 1973a). MILLS (1972) und MILLS und KARPATKIN (1972) klassifizieren ein gerinnbares Produkt I (MG 317.000)

als Vorstufe von X, ein gerinnbares frühes Produkt II, vermindert gerinnbare Intermediärprodukte II und ein nicht mehr gerinnbares Produkt II (MG 257.000) neben den Folgeprodukten III, IV und V, die Y, D und E entsprechen. Bei den von der Gruppe um MOSESSON beschriebenen Fibrinogenen höherer Löslichkeit mit einem Molekulargewicht um 290.000 - 260.000 handelt es sich um frühe Degradationsprodukte, die mit zunehmender Verkürzung der α -Kette auf das Fragment X hinführen (MOSESSON, SHERRY 1966; MOSESSON et al. 1972).

Heterogenitäten mit abnehmendem Molekulargewicht finden sich im Verlauf fortgeschrittener Lyse auch innerhalb des Fragments D mit 6 bis 9 identifizierten Komponenten und des Fragments E mit ca. 3 Komponenten, wie sich immunoelektrophoretisch und diskelektrophoretisch belegen läßt (NILEHN 1967; JAMIESON, GAFFNEY 1968; NIEWIAROWSKI, NANDI 1971; GAFFNEY 1972b; GORMSEN et al. 1972; GORMSEN, FEDDERSEN 1972; GAFFNEY 1973; MOSESSON et al. 1973b; PIZZO et al. 1973a).

Aufgrund der Befunde zahlreicher Autoren und insbesondere in Anlehnung an das Schema von PIZZO (Abb. 6) läßt sich der Abbau der einzelnen Ketten des Fibrinogen- bzw. Fibrinmoleküls im zeitlichen Ablauf der Lyse in folgender Weise formulieren (PIZZO et al. 1972a; PIZZO et al. 1972b; PIZZO et al. 1973a; PIZZO et al. 1973b): Als erstes unterliegt die α -Kette (MG 70.000) in ihrem C-terminalen Anteil der Degradation mit Bildung von α' (MG ca. 25.000) unter Abspaltung der Fragmente A, B, C, im Falle des stabilisierten Gerinnsels in Form vernetzter Bruchstücke. Danach erfolgt die Verkürzung der β -Kette (MG 56.000) von C-terminal zu β' (MG 52.000) und nach weiterer Reduktion der α' -Kette zu α'' (MG ca. 15.000) zu β'' (MG 44.500). In einer relativ frühen Phase verliert die β -Kette ihren N-terminalen Anteil mit dem Fibrinopeptid B. Die γ -Kette ist am resistentersten gegenüber

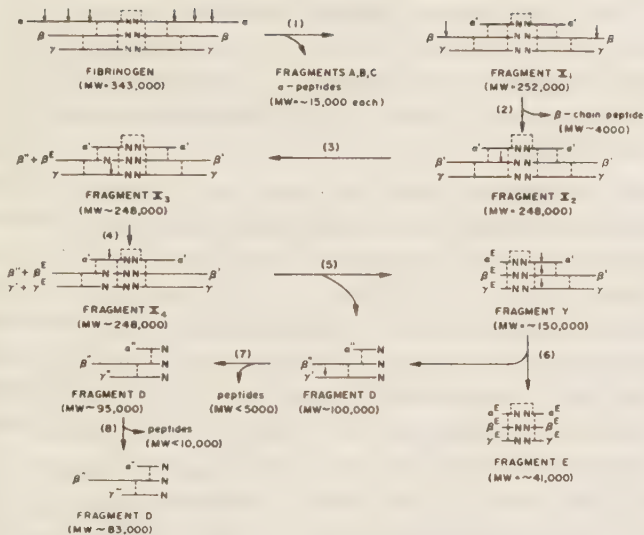


Abb. 6:

Degradation von Fibrinogen durch Plasmin
(aus PIZZO et al. 1972). Interpretation im Text.

Plasmin, wird aber im fortgeschrittenen Stadium der Lyse vom C-terminalen und N-terminalen Ende her verkürzt zu γ''' (MG27.000). Beim Übergang von Fragment X zu Y und D und von Y zu D und E treten durch Spaltung aller drei Ketten innerhalb des Moleküls extrem kurze Kettenfragmente (α^E , β^E , γ^E) bei Y und E auf. D ist ein Monomer, bestehend aus drei Ketten, das drei hydrophobe Disulfidknoten enthält (GARDLUND et al. 1972b). Die Heterogenität von D besteht in der unterschiedlichen Länge der γ -Kette ($\gamma' - \gamma'''$).

FURLAN und BECK (1972) haben im Endlysat zwei D aus jeweils nur zwei Ketten (β und γ) bestehend postuliert. Kürzlich ist das bisher akzeptierte Abbauschema in Frage gestellt worden, indem nicht 2 sondern nur 1 Fragment D als Dimer mit 6 Ketten pro Molekül entstehen soll bei ho-

her Variabilität seiner Kettenlängen (MOSESSON et al. 1973a; MOSESSON et al. 1973b). Fragment Y entsteht danach aus X durch Verlust eines Großteils der β -Kette. D_1 kann aus X und D_2 aus Y durch Fragmentierung des Gesamtmoleküls entstehen.

Fragment E wird übereinstimmend als Dimer aus 6 kurzen Ketten bestehend angesehen, deren Molekulargewichte um 10.000 und darunter liegen (GARDLUND et al. 1972b; KOWALSKA-LOTH et al. 1973; PIZZO et al. 1973a). Während ein frühes E noch Fibrinopeptid A enthält, das durch Thrombin abspaltbar ist - Fibrinopeptid B ist mit dem N-terminalen Ende der β -Kette bis zu Aminosäure 53 in einer frühen Phase verlorengegangen -, ist im E der späteren Phase auch Fibrinopeptid "A" nicht mehr nachweisbar (MARDER et al. 1972; MILLS 1972; MILLS, KARPATKIN 1972; PIZZO et al. 1972b; KOWALSKA-LOTH et al. 1973; LAHIRI, SHAINOFF 1973; MOSESSON et al. 1973b).

Fragment E nimmt am Vernetzungsprozeß bei der Gerinnselstabilisierung nicht teil und ist bei maximaler Lyse von Fibrinogen und Fibrin wahrscheinlich identisch (MOSESSON et al. 1973b). Dagegen liegt D von stabilisiertem Fibrin im Gegensatz zu monomerem D des Fibrinogens als Dimer vor, bestehend aus den D-Monomeren zweier Fibrinmoleküle (GAFFNEY 1973). Während die γ -Kette des monomeren D bis zu γ''' (MG 27.000) spaltbar ist, bleibt die Lyse der γ -Kette des Dimer bei γ' (MG 42.000) stehen, wahrscheinlich nach Liberierung eines N-terminalen Bruchstücks der γ -Kette, als Zeichen dafür, daß der enzymatische Angriff am C-terminalen Ende - dem Ort der Quervernetzung - nach Fibrinstabilisierung behindert ist. Während D-Monomere mit einer γ' -Kette noch ein Substrat für Faktor XIII darstellen, können D-Monomere mit γ'' - und γ''' -Ketten nicht mehr an der Quervernetzung teilnehmen (PIZZO et al. 1973a; PIZZO et al. 1973b).

4. Komplexbildung zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten

Fibrinogen, Fibrinmonomer und deren Derivate Fibrinogen- bzw. Fibrin-Spaltprodukte sind unter haemostaseologischen Gesichtspunkten nicht isoliert zu betrachten, sondern stehen in einem wechselseitigen Bezug zueinander, der vornehmlich die Endphase des Gerinnungsprozesses modifizieren kann. Soweit es die Spaltprodukte angeht, kann die Einflußnahme bis zur klinischen Manifestation einer erworbenen haemorrhagischen Diathese führen. Die antikoagulatorische Wirkung der Spaltprodukte ist erstmals von NIEWIAROWSKI und KOWALSKI (1958) und von TRIANTAPHYLLOPOULOS (1958) beobachtet und beschrieben worden.

Die Interaktion von Fibrinmonomer mit Fibrinogen und den Spaltprodukten führt zur Bildung löslicher Komplexe. Fibrinogen besitzt Polymerisationsstellen, die die Assoziation mit Fibrinmonomeren über die komplementären nach Fibrinopeptidabspaltung freigelegten Polymerisationsbereiche erlauben. Da das Fibrinogenmolekül aber lediglich über die Akzeptorgruppe und nicht, wie das Monomermolekül, zusätzlich über eine bzw. mehrere Donorgruppen verfügt, ist eine fortlaufende Polymerisation ausgeschlossen (SCHERAGA, LASKOWSKI 1955); das Fibrinmonomer ist durch Blockade seiner Polymerisationsbezirke dem Zugriff weiterer Monomere und damit der Gerinnungselbildung entzogen und wird in gelöster Form im umgebenden Medium gehalten. Komplexe sind nicht nur mit Monomer nach Verlust von Fibrinopeptid "A" und Fibrinopeptid B möglich; sie sind in vivo und in vitro auch mit Monomeren nachgewiesen worden, denen durch Reptilaseeinwirkung oder im Beginn eines durch Thrombin ausgelösten Gerinnungsprozesses lediglich Fibrinopeptid "A" fehlt (SHAINOFF, PAGE 1960; SHAINOFF, PAGE 1962; LIPINSKI et al. 1964; LIPINSKI, WOROWSKI 1968; KOWALSKI 1969; WEGRZYNOWICZ et al. 1971; HARDER, STRAUB 1972). Durch Faktor XIII kann eine Stabilisierung des Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplexes

erfolgen (SASAKI et al. 1966). Fibrinogen ist in der Lage, polymerisiertes Monomer über den Weg der Komplexbildung wieder in Lösung zu bringen (SHAINOFF, PAGE 1962). Je nach dem Ausmaß der Peptidabspaltung kann eine unterschiedliche Menge Monomer in Lösung gehalten werden. Sie beträgt bei fibrinopeptidfreien Monomeren ca. 5% der vorhandenen Fibrinogenmenge und steigt bis auf 20% an, wenn man in der Anfangsphase des Gerinnungsprozesses eine zufällig verteilte Fibrinopeptid "A" - Abspaltung annimmt mit einem hohen Anteil von Monomeren, denen nur ein Peptid "A" fehlt (LATALLO et al. 1962; SHAINOFF, PAGE 1962; KIERULF, ABILDGAARD 1971).

Aus dem Gesagten geht hervor, daß trotz vorhandener Thrombinaktivität und Monomerenbildung Fibrinogen eine Schutzfunktion im Organismus ausüben kann, indem es die Monomerpolymerisation bis zu einer bestimmten Schwellenkonzentration verhindert und die Gerinnung mit einer gewissen Latenz eintreten läßt (BLOMBÄCK, LAURENT 1958; HERZIG et al. 1970).

Im Verlauf des Lyse wird zu Beginn ein starker, die Thrombinzeit verlängernder Effekt der Spaltprodukte gefunden, der bei fortschreitender Lyse abklingt und bei Erreichen des Endstadiums mit D und E noch vorhanden ist, aber ein Minimum erreicht hat (NIEWIAROWSKI, KOWALSKI 1958; TRIANTAPHYLLOPOULOS 1958; LATALLO et al. 1964; KOWALSKI 1968; KOWALSKI 1969).

Für den Effekt der Spaltprodukte sind zahlreiche Angriffsorte im System der Gerinnung diskutiert worden. Es wurden angenommen bzw. nachgewiesen eine hemmende Wirkung auf die Thrombin- und Thromboplastinbildung (TRIANAPHYLLOPOULOS 1958; TRIANTAPHYLLOPOULOS, TRIANTAPHYLLOPOULOS 1962; LARRIEU et al. 1966; TRIANTAPHYLLOPOULOS, TRIANTAPHYLLOPOULOS 1971; LARRIEU et al. 1972), auf die Prothrombinkonsumption (TRIANAPHYLLOPOULOS 1958) sowie eine hemmende Wirkung auf Faktor V und Faktor VIII (TRIANAPHYLLOPOULOS, TRIANTAPHYLLO-

POULOS 1971); darüberhinaus wird die Plättchenfunktion - Adhäsivität und Aggregation - inhibiert (KOPEC et al. 1964; KOWALSKI et al. 1964; JERUSHALMY, ZUCKER 1966); weiterhin werden den Spaltprodukten prokoagulatorische Potenzen nachgesagt (TRANTAPHYLLOPOULOS, TRIANTAPHYLLOPOULOS 1971).

Am intensivsten untersucht und von entscheidender Bedeutung für die antikoagulatorische Wirkung der Degradationsprodukte ist der mit der Fibrinpolymerisation interferierende Effekt und der inhibierende Einfluß auf Thrombin, der dem Fragment E zugeschrieben wird. Entsprechend der Abbildung 5 sind Spaltprodukte von Fibrinogen, von Fibrinmonomer bzw. löslichem Fibrin und stabilisiertem Fibrin möglich. FDP-X (von Fibrinogen) und fdp-x (von Fibrin) sind, wenn auch verzögert, gerinnbar (MARDER et al. 1969a; NIEWIAROWSKI et al. 1970; NIEWIAROWSKI, NANDI 1971). Sie verfügen im Gegensatz zu den übrigen Degradationsprodukten noch über eine ausreichende Zahl von Polymerisationsstellen, die im weiteren Lyseverlauf zu Verlust gehen. Die restlichen Spaltprodukte sind aufgrund ihres reduzierten Besatzes mit reaktiven Molekülbezirken lediglich zu Defektpolymeren und zur Bildung löslicher Komplexe befähigt. Komplexe zwischen Fibrin und den Spaltprodukten FDP-X, FDP-Y und FDP-D sowie auch zwischen fdp-x mit FDP-Y und FDP-D sind mittels Ultrazentrifugenuntersuchungen, Isotopenmethoden und gerinnungsphysiologischen Parametern vielfach nachgewiesen worden (ALKJAERSIG et al. 1962; LATALLO et al. 1962b; FLETCHER et al. 1966; FISHER et al. 1967; LIPINSKI et al. 1967; MARDER et al. 1967; MARDER, SHULMAN 1969; NIEWIAROWSKI et al. 1970; WEGRZYNOWICZ et al. 1971; LARRIEU et al. 1972; ARNESEN, GODAL 1973). Die stärkste antikoagulatorische Wirkung kommt dem Fragment Y zu, wie sich aus der extremen Verlängerung der Thrombinzeit bei Zugabe von Spaltprodukten des Stadium II vermuten und bei Verwendung von isoliertem Fragment Y im Gerinnungs-

ansatz beweisen läßt (MARDER et al. 1967; MARDER, SHULMAN 1969). Die dominierende antikoagulatorische Potenz beruht einmal auf der nicht mehr vorhandenen Gerinnbarkeit im Gegensatz zu FDP-X und der im Vergleich zu FDP-D noch höheren Verfügbarkeit von Polymerisationsarealen im Molekül. Die Spaltprodukte halten während des Gerinnungsprozesses einen Teil der Monomere löslich im Überstand und verhindern bei ausreichend hoher, allerdings unphysiologischer Konzentration eine Gerinnsselbildung überhaupt (LIPINSKI et al. 1967), werden aber auch unter Bildung eines defekten Gerinnsels ins Fibrinnetz inkorporiert (BANG et al. 1962; BANG 1964; BANG 1967). Der zusätzlich auch für die frühen Spaltprodukte geforderte Antithrombineffekt (LATALLO et al. 1964; LARRIEU et al. 1972) könnte auf einer Konkurrenz der Degradationsprodukte, die in ihrem frühen Stadium noch Fibrinopeptide enthalten, mit Fibrinogen um das Thrombin beruhen.

Fragment E, dem keine polymerisationshemmende Wirkung zugeschrieben wird und das die Gerinnsselstruktur nicht beeinflußt, wird als überwiegender oder ausschließlicher reversibler Thrombininhibitor angesehen, indem es möglicherweise die Bindungsstellen für Fibrinogen am Thrombin besetzt; Fragment E entstammt dem die Fibrinopeptide enthaltenden N-terminalen Bereich des Fibrinogens (BANG et al. 1962; LARRIEU et al. 1972; ARNESEN, GODAL 1973; KOWALSKA-LOTH et al. 1973).

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Monomeren und Spaltprodukten sind zahlreiche Methoden angegeben worden, die in ihrer Spezifität unterschiedlich und für die einzelnen Fibrinogenderivate ungleich empfindlich sind. Insgesamt nimmt die Sensibilität der Teste gegenüber kleineren Spaltprodukten ab. Die Teste sollen hier nur kurz aufgezählt werden.

Der Nachweis von Monomeren im Plasma wird mit Agentien geführt, die eine Trennung der Fibrinogen-Monomer-Kom-

plexe mit nachfolgender, als Parakoagulation (DERECHIN, SZUCHET 1956; KOPEC et al. 1961) bezeichneter Präzipitation oder Gelierung der Fibrinmonomere hervorrufen. Beim Äthanoltest induziert der zu einer Plasmaprobe gegebene Alkohol eine Dissoziation vorhandener Komplexe mit End-zu-End - Aggregation der Monomere (GODAL, ABILDGAARD 1966; BREEN, TULLIS 1968). Der Test wird bei 1 - 2% Fibrin im Plasma positiv, das Gel enthält neben Fibrin bis zu 30% Fibrinogen (GODAL, KIERULF 1972). Der Protaminsulfatetest ist empfindlicher, obwohl ebenfalls störanfällig, und läßt eine gewisse Quantifizierung zu (LIPINSKI, WOROWSKI 1968; NIEWIAROWSKI et al. 1970; NIEWIAROWSKI, GUREWICH 1971; LIPINSKI, GUREWICH 1972; GUREWICH et al. 1973). Während der Protaminsulfatetest auch auf frühe Fibrinspaltprodukte (fdp-x) anspricht, sind die Angaben für den Äthanoltest in diesem Punkt widersprüchlich (NIEWIAROWSKI et al. 1970; NIEWIAROWSKI, GUREWICH 1971; GUREWICH et al. 1973). Der Monomernachweis über die von Faktor XIII abhängige Inkorporation von radioaktiv markiertem Glycinäthylester in Fibrinogen-Fibrinmonomerpräzipitate aus Plasma ist spezifisch, aber aufwendig. Der Nachweis von löslichen Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplexen läßt sich auch diskelektrophoretisch und säulenchromatographisch führen (FLETCHER et al. 1970; FLETCHER, ALKJAERSIG 1970; VERMYLEN et al. 1971; GRAEFF et al. 1973; v. HUGO, GRAEFF 1973a; v. HUGO, GRAEFF 1973b; v. HUGO, GRAEFF 1973c).

Folgende Tests, die ebenfalls sensibel gegenüber Fibrinogen und Fibrinmonomer sind, dienen zum Nachweis von Fibrin(-ogen-)spaltprodukten: einmal der sogenannte "tanned red cell haemagglutination inhibition immunoassay" (TRCHII-Test) (MERSKEY et al. 1966; MERSKEY et al. 1969). Er basiert auf der Inhibition der Agglutination mit Fibrinogen überzogener Erythrozyten durch Neutralisation der im Ansatz vorhandenen Antikörper durch Spaltprodukte. Der von ALLINGTON (1971) modifizierte

Latex-Test basiert auf dem gleichen Prinzip, benutzt aber Latexpartikel anstelle von Erythrozyten. Der ursprüngliche Latex-Test (Fi-Test) verwendet mit Antikörpern überzogene Latexpartikel zur direkten Agglutination über vorhandene Spaltprodukte (MELLINGER 1970; HULME, PITCHER 1973). Der Staphylococcal Clumping Test benutzt die spezifische Agglutination eines bestimmten Staphylokokkenstammes (Staph. aureus, Newman D₂C) in Gegenwart von Fibrinogen verwandtem Material zum Nachweis (HAWIGER et al. 1970). Abschließend zu erwähnen sind noch der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende Praecipitin-Test (FERREIRA, MURAT 1963), der Radioimmunoassay (CATT et al. 1968) und die Immundiffusionstechnik (MANCINI et al. 1965).

5. Phänomenologie umsatzbedingter Haemostasestörungen

Unter physiologischen Bedingungen der Haemostase befinden sich die Faktoren der Gerinnung und der Fibrinogen(-lyse) in ständiger wechselseitiger Abhängigkeit von ihren Aktivatoren und Inhibitoren und in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander. Darüberhinaus bestehen Bezüge zu nicht spezifisch dem Gerinnungssystem angehörenden, prokoagulatorisch und fibrinolytisch wirkenden proteolytischen Enzymen sowie zu cellulären Bestandteilen des Organismus (Blutzellen, Reticuloendotheliales System etc.). Einer postulierten kontinuierlichen latenten Gerinnung steht eine unterschwellig ablaufende Fibrinolyse gegenüber (LASCH, ROKA 1953; ASTRUP 1956; ASTRUP 1966; LASCH 1971). Das verbindende Glied dieser beiden Systeme stellt das Fibrinogen-/Fibrinmolekül dar, das Substrat für Thrombin und Plasmin.

In Phasen der Hypozirkulation im Kreislaufschock, bei Haemolyse, Sepsis, in der Geburtshilfe, bei malignen Tumoren und bestimmten operativen Eingriffen (Prostata, Lunge) - um nur einige Ursachen zu nennen -, kann durch Einschweben prokoagulatorischer Substanzen in die Blutbahn eine systemische Verschiebung des haemostatischen Gleichgewichts in Richtung einer Hyperkoagulabilität erfolgen, die mit einer Aktivitätssteigerung der Gerinnungsfaktoren einhergeht (CROWELL, READ 1955; LASCH et al. 1961b; LASCH 1971; HEENE, LASCH 1973). Falls die antagonistischen Prinzipien nicht ausreichen, den erhöhten Umsatz der Gerinnungsfaktoren zu bremsen, führt freizirkulierendes Thrombin zum Auftreten von Fibrinmonomeren in Form löslicher Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplexe in der Zirkulation. Bei Persistieren und Verstärkung der Umsatzsteigerung schlägt das System bei Überschreiten seiner Kapazität für gelöstes Fibrinmonomer in eine disseminierte intravasculäre Gerinnung mit begleitender Verbrauchskoagulopathie und nachfolgender

Hypokoagulabilität um, die in einem progressiven Aufbrauch entscheidender Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten ihren Ausdruck findet (LASCH et al. 1961a; LASCH et al. 1961b; LASCH et al. 1966; LASCH et al. 1967; LASCH 1969; HEENE, LASCH 1973). Der ablaufende Prozeß stellt sich in dem gerinnungsanalytisch nachweisbaren Abfall des Fibrinogens, der Faktoren II, V, VIII und XIII, der Thrombozyten und entsprechender Veränderungen der Globalteste dar (HEENE 1970; HEENE 1971; HEENE, LASCH 1973). Eine sekundäre sich anschließende Fibrinolyse ist häufig zu beobachten. In seltenen Fällen treten primäre Fibrinogenolysen ohne vorherigen Ablauf einer Gerinnung auf (FLETCHER, ALKJAERSIG 1966; LASCH et al. 1966; MERSKEY et al. 1966; FISHER et al. 1967; BREEN, TULLIS 1968).

Von entscheidender Bedeutung für den rechtzeitigen Beginn einer gezielten Therapie noch in der Anfangsphase dieser potentiell deletären Krankheitsbilder ist die frühzeitige Diagnose, bevor es zu einem gravierenden haemostatischen Defekt gekommen ist. Neben dem mehr indirekten Nachweis aus der Kombination mehrerer Gerinnungsparameter ist der frühzeitige direkte, spezifische und quantitative Nachweis noch gelöster Fibrinmonomere und von Fibrin(-ogen-)spaltprodukten die Methode der Wahl. Diesem Ziel dienen die im Folgenden entwickelte Methodik und die ersten mit ihr erhobenen Befunde.

C. Experimenteller und klinischer Teil

I. Beschreibung übernommener und modifizierter Methoden

Fibrinogen: Es wurden verwendet 1) Humanfibrinogen Kabi (Stockholm, Schweden); entspricht der Fraktion I-4 nach BLOMBÄCK und BLOMBÄCK (1956), 92 - 96% gerinnbar; 2) nach der Methode von Kekwick et al. (1955) präpariertes Rinderfibrinogen: a. Plasma (Ausgangsmenge 1 l) stehen lassen bei 4°C über 10 Std.; b. erste Fällung mit Diäthyläther, 11% Volumenendkonzentration, Temperatur 0°C; stehen lassen bei 4°C über 24 Std.; c. Niederschlag abzentrifugieren und bei 0°C 4mal waschen mit 1 l einer Mischung von 100 ml Diäthyläther + 900 ml 0,85% NaCl, 0,37% Trinatriumcitrat; d. Niederschlag in 400 ml 0,06 M Trinatriumcitratpuffer pH 6 lösen, 2 Std. bei Zimmertemperatur rühren, zentrifugieren und Niederschlag verworfen; e. zu 1 Teil Überstand 5 Teile aqua dest (Temperatur 0°C); Diäthyläther bis 0,5% Volumenendkonzentration zugeben; 24 Std. bei 4°C stehen lassen, danach filtrieren und zu je 100 ml Filtrat 6,6 ml einer Lösung von 8,5% NaCl, 3,7% Trinatriumcitrat geben; auf pH 7,0 mit 0,2 M Na₂HPO₄ einstellen; f. zweite Fällung mit Diäthyläther, 11% Volumenendkonzentration, Temperatur 0°C, stehen lassen 24 Std. bei 4°C; g. Niederschlag abzentrifugieren: Fibrinogenpräparation ca. 94 - 96% gerinnbar.

Präparation von Fibrinogenspaltprodukten: 1 g Fibrinogen Kabi wurde im Originalpuffer mit 10.000 E Strptokinase (Test-Streptase, Behringwerke, Marburg) bei 37°C inkubiert. Die Lysedauer zur Herstellung von Fragment X (FDP-X) und Fragment Y (FDP-Y) betrug 50 Min., für Fragment D (FDP-D) und E (FDP-E) 24 Std. Lysestopp erfolgte mit 50.000 KIE Trasylol^R (Bayer, Leverkusen).

FDP-X und FDP-Y wurden nach den Angaben von MARDER et al. (1969a) über Sephadex G 200 (Pharmacia Uppsala, Schweden) getrennt; Säulenlänge 2 x 100 cm, Durchmesser 6 cm; Elutionsgeschwindigkeit 40 ml/h. Statt Epsilon-

aminocaprinsäure (EACA) und Sojabohnentrypsininhibitor (STI) wurden dem Elutionspuffer 100 KIE Trasylol^R pro ml zugesetzt.

Reinigung des Endlysats ohne Trennung der Komponenten FDP-D und FDP-E (FDP-D+E) erfolgte ebenfalls über Sephadex G 200. Trennung von FDP-D und FDP-E wurde nach MARDER et al. (1969b) über Pevikonblockelektrophorese und nach GARDLUND et al. (1972b) säulenchromatographisch an Sephadex G 100 mit 10%iger Essigsäure als Elutionsmittel durchgeführt; Säulenlänge 100 cm, Durchmesser 6 cm; Elutionsgeschwindigkeit 40 ml/h.

Nach immun- und diskelektrophoretischer Prüfung nicht ausreichend saubere Präparationen wurden erneut einem Trennungsprozeß unterzogen. Ein weiteres, neu entwickeltes Verfahren zur Trennung der Lyseendprodukte wird weiter unten beschrieben.

Quantitative Bestimmung von Fibrinogen und seinen Derivaten

Tyrosinmethode nach ASTRUP et al. (1965): zur Messung des Fibrinogengehalts von Plasmaproben und zur Bestimmung des gerinnbaren Materials einer Fibrinogenlösung durch Messung des Gerinnselproteins in Relation zum Gesamtproteingehalt wurde wie folgt verfahren: Verdünnung von 0,5 ml eingesetzter Probe mit 4,5 ml 0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,05 M EACA (Hoffmann-La Roche, Grenzach) pH 7,4. Zusatz von 1 ml $\hat{=}$ 100 E Thrombin (Topostasin, Hoffman - La Roche, Grenzach) und Inkubation 60 Min. bei 37°C. Danach Herauswinden des Gerinnsels mit einem Glasstab, 2maliges Waschen mit je 10 ml 0,15 M NaCl und Überführen in 1 ml 2,5 N NaOH. Nach Hydrolyse des Fibrins im kochenden Wasserbad über 20 Min. weiteres Vorgehen identisch mit den Angaben von ASTRUP et al. (1965). Extinctionsmessung im Zeiss PM 4 Photometer, Wellenlänge 710 nm, Küvette 1 cm. Die Extinction wird ausgedrückt in mg Tyrosin anhand einer Eichkurve (L-Tyrosin, Serva, Heidelberg) und in mg Fibrinogen umgerechnet; Umrech-

nungsfaktor 11,7. Bei Bestimmung des Gesamtproteins einer Fibrinogenlösung wird auf die Gerinnung verzichtet.

Die Micro-Kjeldahl-Methode (KJELDAHL 1883) wurde nach den Angaben von LANG (1957) durchgeführt; Umrechnungsfaktor von Stickstoff auf Protein 6,25 (MARDER et al. 1969a).

Zur radialen Immundiffusion nach MANCINI et al. (1965) wurden Partigen^R-Platten mit Kaninchenantihumanfibrinogen benutzt (Behringwerke, Marburg).

Bei den spectrophotometrischen Proteinbestimmungen des Fibrinogens und seiner Spaltprodukte stimmten die von MARDER et al. (1969a) angegebenen Extinctionskoeffizienten für 1%ige Lösungen, 1 cm Schichtdicke und 280 nm Wellenlänge mit den eigenen über die Micro-Kjeldahl-Methode in 0,1 M Natriumphosphatpuffer bestimmten überein: Fibrinogen: 15,1; FDP-X: 14,2; FDP-Y: 17,6; FDP-D: 20,8; FDP-E: 10,2. Bei Verwendung anderer Puffer als dem oben angegebenen waren geringfügige Korrekturen notwendig. Der Extinctionskoeffizient für gereinigtes, aber nicht getrenntes D und E (FDP-D+E) in Puffer A (siehe unten) wurde mit 14,2 bestimmt.

Die radioaktive Markierung des nach KEKWICK et al. (1955) präparierten Rinderfibrinogens mit in Dioxan gelöstem Tritium-markierten Essigsäureanhydrid erfolgte nach den Angaben von WEGRZYNOWICZ et al. (1973, 1974). Die molare Relation im Reaktionsansatz zwischen H₃-Essigsäureanhydrid und Fibrinogen betrug 10:1. Nicht gekoppelte Essigsäure wurde durch Dialyse entfernt. Fibrinogen wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht denaturiert; die Gerinnbarkeit ist voll erhalten. Die in der Präparation vorhandene nicht gerinnbare und nicht durch Trichlor-essigsäure fällbare Aktivität betrug zwischen 1 und 2%. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte nach Einpipettieren von 0,1 ml Proteinlösung - gegebenenfalls nach Verdünnung mit 5%iger Essigsäure - in Bray'sche Lösung (BRAY 1960) in Polyäthylenfläschchen im Flüssigkeitsszintillations-

zähler (Tri Carb 3380/544, Packard). Der Quench wurde durch interne Standardisierung eliminiert.

Die Immunelektrophorese wurde nach SCHEIDEGGER (1955) durchgeführt unter Benutzung von Agarose und eines 0,1 M Acetat-Barbitalpuffers pH 8,6; Probenvolumen 2 μ l der 450 mg%igen Testlösung; Antiserum: 50 μ l Kaninchen-Anti-humanserum gegen Fibrinogen, FDP-D und FDP-E (Behringwerke, Marburg).

TAME-Test: p-Toluolsulfonyl-L-argininmethylester (Serva, Heidelberg) wurde entsprechend den Angaben von ROBERTS (1958) und ROBERTS und FLEMING (1972) benutzt als Substrat zur Prüfung der möglichen Thrombinrestaktivität der Präparation von Fibrinmonomer-Agarose (FM-ag).

a. Zu 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,2 und 1,0 ml 0,1 M TAME wurden bei 37°C 1,5 ml einer wässrigen FM-ag-Suspension entsprechend 60 mg FM-ag Trockengewicht zugefügt. b. Aliquots von 1 ml wurden zur Zeit 0, nach 15 Min. und 30 Min. entnommen und zu 2 ml einer Mischung von 2 M Hydroxylamin-Hydrochlorid und 3,5 M NaOH zu gleichen Teilen gegeben. c. Nach einer Reaktionszeit von 60 Min. Zugabe von 1 ml einer HCl-Trichloressigsäuremischung (1 Teil HCl, spez. Dichte 1,18, + 2 Teile aqua dest; 6 g Trichloressigsäure gelöst in 100 ml der verdünnten HCl-Lösung), über 3 Std. stehen lassen bei Zimmertemperatur. d. Nach Zentrifugation bei 1800 g über 10 Min. Zugabe von 1 ml Überstand zu 4 ml einer 0,11 M Eisen-III-chloridlösung in 0,04 M HCl. e. Messung der Extinction bei 525 nm im Zeiss PM 4 Spectrophotometer. Entsprechende Leerwerte zur Messung der Spontanhydrolyse von TAME und Proben gleichen Gewichts wie oben angegeben von Sepharose 6 B und Fibrinogen-Agarose (FG-ag) liefen parallel. Zur Prüfung der Empfindlichkeit der Methode gegenüber Thrombin wurde eine Versuchsreihe mit 0,5; 1; 2; 4; und 8 E Thrombin-Endkonzentration pro ml angesetzt (Thrombinum purum, Behringwerke, Marburg). Eine meßbare TAME-Hydrolyse wurde ab 1 E Thrombin pro ml beobachtet.

Quantitativer Äthanoltest: (in modifizierter Form nach GODAL und ABILDGAARD, 1966, sowie BREEN und TULLIS, 1968) Zu 1,1 ml Plasma wurden 0,3 ml 50%iges Äthanol (v/v) gegeben. Die nach 30 Min. erschütterungsfreiem Stehen bei Zimmertemperatur entstandenen Gele wurden mit einem Glasstab aus dem Plasma entfernt, 1mal mit 0,15 M NaCl und 1mal mit aqua dest gewaschen und in 1,0 ml von 2,5 N NaOH überführt. Weiter wurde verfahren wie bei der Tyrosinmethode beschrieben.

Thrombinzeitbestimmung: 0,1 ml Fibrinogenlösung 450 mg% bzw. Plasma + 0,1 ml Spaltproduktlösung entsprechend einer 450 mg%igen Fibrinogenlösung bzw. Puffer + 0,1 ml Thrombinlösung, 6 E/ml (Test-Thrombin, Behringwerke, Marburg).

Die Messung der Plasminaktivität wurde durchgeführt mit der Fibrinplattenmethode mit erhitzten Platten nach BRAKMAN und ASTRUP (1971) und mittels Caseinhydrolyse mit der nach REMMERT und COHEN modifizierten Technik wie von KLINE (1971) beschrieben.

Die Diskelektrophorese zur Analyse des Fibrinogenendlysats (s. Abschnitt C II 2.c1) wurde durchgeführt nach den Angaben von WEBER und OSBORN (1969) und DUNKER und RUECKERT (1969) mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS); Trenngel 7,5% Acrylamid. Die Proben waren gelöst in 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 0,1% SDS, 8 M Harnstoff. Die diskelektrophoretische Trennung der Ketten reduzierten Fibrinogens (s. Abschnitt C IV 2) erfolgte in einer Modifikation nach SWANK und MUNKRES (1971) in 0,05 M Tris- H_3PO_4 , pH 6,8. Trenngel: 5% Acrylamid, 0,35% Bisacrylamid, 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumpersulfat. Elektrodenpuffer: 0,01 M Tris- H_3PO_4 pH 6,8. Elektrophorese 6 Std. mit 7,5 mA pro Röhrchen.

Die Färbung erfolgte jeweils mit 0,25% Coomassie Brilliant Blau R 250 (Serva, Heidelberg) in wäßriger Lösung von Essigsäure 7% und Methanol 5% über 2 Std. Entfärbung im

gleichen Essigsäure-Methanol-Gemisch über 3 Tage.

Der Staphylococcal Clumping Test wurde nach den Angaben der Herstellerfirma (Behringwerke, Marburg) durchgeführt.

Plasma: Plättchenarmes Plasma; Antikoagulans: 0,1 M Natriumcitrat, 0,02 M Di-Natrium-Äthylendiamintetra-Essigsäure (EDTA, Merck, Darmstadt), Trasylol^R 500 KIE/ml; Verhältnis Blut zu Antikoagulans 9:1.

Serum: Inkubation von Nativblut 24 Std. bei 37°C in Gegenwart von 50 KIE Trasylol^R pro ml.

II. Beschreibung neu entwickelter Methoden und Verfahren

1. Herstellung und Verhalten von insolubilisiertem Fibrinogen

a. Insolubilisierung von Fibrinogen und Umwandlung in insolubiliertes Fibrinmonomer

Die Präparation von Fibrinogenagarose (FG-ag) wurde in Analogie zur Proteininsolubilisierung von AXEN und ERNBACK (1971) entwickelt (HEENE, MATTHIAS 1973).

Aktivierung von Agarose durch Cyanbromid

Für die Präparation unter Standardbedingungen wurden 25 ml einer Suspension von Sepharose 6 B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einem Glasfiltertrichter (Schott, Mainz, No. 17-D₃, Porendurchmesser 15 - 40 μ) über einem Büchner-Tunnel vom Suspensionsmittel befreit, mit 100 ml aqua dest pro 100 mg Sepharose 6 B Trockengewicht gewaschen und über ca. 5 Min. trockengesaugt (ca. 6% der Suspension entfallen auf Sepharose 6 B Trockengewicht).

Eine Gelmenge, entsprechend 1 g Sepharose 6 B Trockengewicht wurde in 50 ml aqua dest. suspendiert und unter ständigem Rühren bei 20° - 23°C mit 40 ml einer 2,5%igen wässrigen Cyanbromidlösung (25 mg/ml) gemischt. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde sofort mit 2 N NaOH auf pH 11 eingestellt und dort unter Kontrolle eines pH-Meters gehalten. Nach etwa 9 - 10 Min. war die Reaktion abgeschlossen, erkennbar an dem Sistieren des pH-Abfalls; die aktivierte Sepharose wurde sogleich über einer Glasfilterfritte mit eiskalter 0,1 M Natriumbicarbonatlösung gewaschen (300 ml pro 100 mg akt. Agarose Trockengewicht).

Nach anschließendem Waschvorgang mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,8 (100 ml/100 mg akt. Agarose Trockensubstanz) wurde das Gel in 25 ml des genannten Puffers zur Kopplung mit Fibrinogen suspendiert.

Chemische Kopplung von Fibrinogen an die aktivierte Agarose

1 - 1,5 g Fibrinogen wurden in 50 - 75 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,8 gelöst und über 24 Std. bei 4°C unter mehrfachem Pufferwechsel gegen 10 - 15 l desselben Puffers dialysiert. 1 g Fibrinogen in 50 ml Puffer wurde zu der Suspension von 1 g aktivierter Sepharose 6 B gegeben. Die Reaktion lief 16 - 18 Std. bei 4°C unter Stickstoffatmosphäre ab. Danach wurde das an Agarose fixierte Fibrinogen in ein Chromatographierohr überführt und in folgenden Puffern bei 4°C und einer Flußgeschwindigkeit von 80 - 100 ml/h gewaschen:

1. 0,1 M Natriumphosphat pH 7,8 6 Std.; 2. 0,1 M Tris-H₃-PO₄, 1 M NaCl pH 8,6 24 Std.; 3. 0,1 M Tris-H₃-PO₄, 1 M NaCl pH 4,1 12 Std.; 4. 0,1 M Natriumbicarbonat, 0,2 M Glycin pH 7,6 12 Std.; 5. 0,05 M Tris-H₃-PO₄, 0,1 M NaCl pH 7,8 12 Std. Allen Puffern war 0,025 M EACA oder 50 - 100 KIE Trasylol^R pro ml zur Verhinderung einer Fibrinogenolyse zugesetzt. Bei nicht sofortigem Gebrauch wurde das Produkt in Puffer A (= Puffer Nr. 5 unter Zusatz von 100 KIE Trasylol^R und 0,005 M Di-Na-EDTA) mit 0,02% Natriumacid suspendiert und bei 4°C gelagert. Der bei den Chromatographieversuchen neben Puffer A verwendete Puffer B bestand aus 0,05 M Tris-H₃PO₄, 1,0 M NaCl, pH 4,1 mit Zusatz von 100 KIE Trasylol^R und 0,005 M Di-Na-EDTA.

Quantitative Bestimmungen des Fibrinogens wurden mit der Kjeldahl-Methode im Überstand nach Kopplung zur Ermittlung der Kopplungsrate, im Endprodukt als Kontrolle und vor Einsatz in jede Versuchsreihe durchgeführt. Die Fibrinogen-Agarose (FG-ag) wurde dazu mit aqua dest bzw. Puffer über der Glasfilterfritte gewaschen, abgesaugt und im Exsiccator über Phosphorpentoxyd und NaOH-Plättchen getrocknet. Als Leerwerte dienten in gleicher Weise behandelte Proben von Sepharose 6 B.

Umwandlung von Fibrinogen-Agarose (FG-ag) in Fibrinmonomer-Agarose (FM-ag)

FG-ag entsprechend 1 g Fibrinogen wurde über der Glasfilterfritte mit 300 ml Puffer A unter Zusatz von 0,01 M Di-Na-EDTA und 0,001 M p-Chloromercuribenzoat (PCMB) (Serva, Heidelberg) gewaschen und danach in 60 ml desselben Puffers suspendiert. Danach erfolgte Zugabe von 40 ml Puffer mit angegebenen Zusätzen sowie 500 NIH Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke, Marburg) und 10.000 KIE Trasylol^R unter ständigem Rühren bei 20° - 23°C über 10 Minuten. Bei Präparation von Fibrinmonomer durch Reptilase wurde Thrombin durch 10 Ampullen Reptilase ersetzt (Pentapharm, Basel, Schweiz). Die Suspension wurde über 3 - 4 Stunden gerührt, danach über der Fritte abgesaugt und mit 500 ml Puffer A unter Zusatz von 0,01 M Di-Na-EDTA und 0,001 M PCMB gewaschen und trockengesaugt. Nach Suspendieren in 100 ml 0,1%iger Essigsäure und Rühren über 30 Min. wurde das Reaktionsprodukt erneut mit 300 ml Puffer A, diesmal nur unter Zusatz von 0,01 M Di-Na-EDTA, gewaschen. Daraufhin wurde das FM-ag 3mal für 20 Min. im Wechsel in 3 bzw. 6 M Harnstoff und 300 ml Puffer A mit 0,01 M Di-Na-EDTA gerührt. Es folgte Probenentnahme zur Prüfung auf Thrombinrestaktivität im TAME-Test. Abschließend erfolgte 2maliges Suspendieren über 30 Min. in je 300 ml Puffer A unter Zusatz von 0,001 M TAME und Nachwaschen mit 500 - 1000 ml Puffer A bzw. einem dem geplanten Versuch entsprechenden Puffer. Bei Präparation von FM-ag durch Reptilase wurde zusätzlich in einem Chromatographierohr 6 Std. mit 0,1%iger Essigsäure und 24 Std. mit 6 M Harnstoff gewaschen.

b. Untersuchungen zum Verfahren der Insolubilisisation -
Verhalten des insolubilisierten Fibrinogens und
Fibrins:

Tabelle 1 zeigt, daß die besten Kopplungsbedingungen für Fibrinogen an aktivierte Agarose in einem pH-Bereich von 7,5 - 8,0 gegeben sind; etwa 85% des zugegebenen Fibrinogens werden chemisch fixiert (Tyrosinmethode). Für diese Untersuchungen wurde, um ein pH über 8,0 zu erreichen, anstelle von 0,1 M Natriumphosphatpuffer ein 0,05 M Natriumtetraborat-Kaliumphosphat-Puffer verwendet.

pH	mg FG pro 100 mg akt. Agarose	mg FG im Überstand nach Kopplung	% vom Gesamt-FG
7.0	39.3	7.55	19.2
7.5	40.1	5.82	14.5
8.0	40.7	5.89	14.6
8.5	41.6	9.99	24.0
9.0	38.7	10.64	27.4

Tab. 1:

pH-Optimum für die Kopplung von Fibrinogen (FG) an aktivierte Agarose (Trockengewicht)

Zur Ermittlung der Kapazität der aktivierten Agarose zur chemischen Kopplung von Fibrinogen wurden zu konstanten Mengen aktivierter Agarose steigende Mengen von Fibrinogen zugesetzt (Tab. 2). Nach Abschluß der Kopplungsreaktion wurde nach Kjeldahl über den Stickstoffgehalt die fixierte und die noch im Überstand gelöste Proteinmenge

bestimmt und zu der Ausgangsmenge in Beziehung gesetzt (jeweils Doppelbestimmungen). Zur Entfernung des bei der Kopplungsreaktion freiwerdenden Ammoniaks wurden die Überstände vor der Analyse dialysiert. Der Stickstoffgehalt von Sepharose 6 B betrug 0,078 mg pro 100 mg Trockengewicht, der von aktivierter Agarose aufgrund der eingeführten Cyangruppen 2,85 mg pro 100 mg Trockengewicht.

A	B	C	B + C	B	C
mg FG pro 100 mg akt. Agarose	mg FG gekoppelt an 100 mg akt. Agarose	mg FG im Überstand nach Kopplung	mg FG (= 100 %)	%	%
47.7	45.9	1.06	46.96	97.7	2.3
49.2	53.5	0.46	53.96	99.1	0.9
72.5	68.7	5.04	73.74	93.2	6.8
121.0	114.3	17.20	131.50	87.0	13.0
166.5	118.8	53.80	172.60	68.8	31.2
277.0	140.5	122.30	262.80	53.5	46.5

Tab. 2:

Kopplung steigender Fibrinogenmengen an konstante Mengen aktivierter Agarose (Trockengewicht)

Die Daten der Tabelle 2 machen deutlich, daß bei einem Verhältnis von Fibrinogen zu aktivierter Agarose von 1:2 im Reaktionsansatz sämtliches Fibrinogen fixiert wird, während bei einer Relation von 2,8:1 absolut zwar erheblich mehr, relativ aber nur 50% der eingesetzten Menge gebunden werden. Soweit es die Genauigkeit der Kjeldahl-Methode zuläßt, kann gesagt werden, daß alle Cyangruppen auch bei niedriger Fibrinogenkonzentration durch das Protein blockiert sind, da die Summe des fixierten und des

im Überstand verbleibenden Proteinstickstoffs den Stickstoffgehalt des eingesetzten Fibrinogens nicht übersteigt.

Für die Brauchbarkeit des insolubilisierten Fibrinogens und Fibrinmonomers für Versuche zur Komplexbildung wie zur Adsorption und Elution von Fibrinogen und seinen Derivaten beim klinischen Einsatz war die Frage nach der irreversiblen Fixation an die Agarose und der Stabilität des Produktes in unterschiedlichem Milieu zu prüfen. Eine Veränderung und/oder Degradation des insolubilisierten Materials durch die Puffer selbst und durch Enzyme des Plasmas würden die Qualität des Produkts mindern und bei Freisetzung von Fibrinogen verwandtem Material zu nicht korrekten Meßwerten führen. Durch Elutionsversuche mit Tritium-markiertem insolubilisierten Rinderfibrinogen - präpariert nach KEKWICK et al. (1955) - und mit markiertem insolubilisierten Fibrinmonomer konnte gezeigt werden, daß nach Abschluß beschriebener Waschvorgänge weder mit Puffer A, Puffer B, 6 M Harnstoff noch durch Serum und Plasma Radioaktivität freigesetzt wurde. Bis über 0,5 E Thrombin pro ml aufgetragenes Plasma wurde durch die Antithrombine des Plasmas bei Zusatz von 0,001 M TAME zu den Elutionspuffern neutralisiert.

Zur Prüfung des Adsorptions- bzw. Komplexbildungsverhaltens von FG-ag und FM-ag gegenüber löslichem Fibrinogen und seinen Derivaten wurde je eine Säule von 0,9 x 28 cm mit FG-ag und FM-ag entsprechend je 1,0 g Protein gefüllt (Abb. 7). Nach Äquilibration mit Puffer A wurden 34,4 mg einer reinen Fibrinogenlösung in Puffer A (649 mg/100 ml; Probenvolumen 5,3 ml) auf die FG-ag - Säule aufgetragen und mit Puffer A gefolgt von Puffer B eluiert (Elutionsgeschwindigkeit 21 ml/h). Sämtliches Fibrinogen erscheint in Peak I (Abb. 7 oben); mit Puffer B ließ sich immunologisch kein Fibrinogen verwandtes Material nachweisen. Kontrollen mit Tritium-markiertem Fibrinogen in Puffer und Plasma bestätigten den Befund

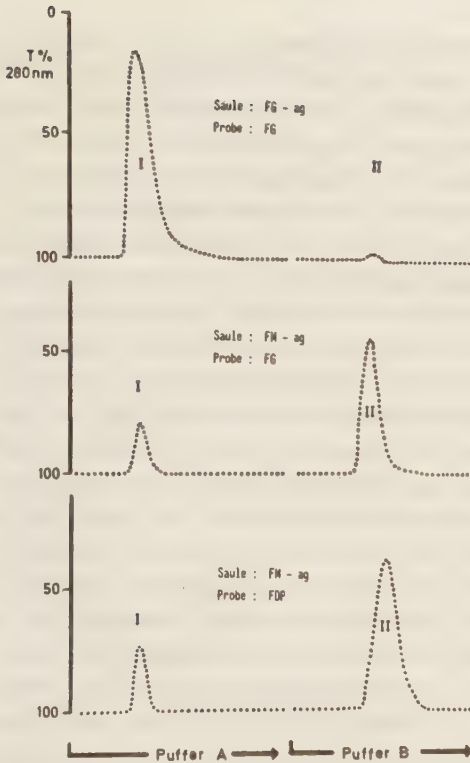


Abb. 7:

Elutionsdiagramm von reinem Fibrinogen nach Chromatographie an FG-ag (oben) und FM-ag (Mitte) sowie von Fibrinogen-Spaltprodukten an FM-ag (unten).
Säule: $0,9 \times 28 \text{ cm} \approx 1 \text{ g}$ FG bzw. FM; Auftrag $5,3 \text{ ml} \approx 34,4 \text{ mg}$ FG bzw. $32,3 \text{ mg}$ FDP; Elutionsgeschwindigkeit 21 ml/h

(Rinderfibrinogen im gesamten System). Bei Zugabe von markiertem Fibrinmonomer zu Fibrinogenlösungen und Plasma erschien nach Elution mit Puffer B ein hoher Peak II, der Fibrinogen verwandtes Material und 95% der eingesetzten Radioaktivität enthielt (nicht dargestellt). Damit ist erwiesen, daß FG-ag Fibrinmonomer reversibel adsorbieren kann, Fibrinogen jedoch nicht adsorbiert.

Wenn 34,4 mg Fibrinogen über eine Säule insolubilisierten Fibrinmonomers chromatographiert wurden (Abb. 7 Mitte), erschien neben Peak I mit Puffer B, entsprechend dem Phänomen der Komplexbildung, ein höherer Peak II, der 20,8 mg = ca. 60% der aufgetragenen Fibrinogenmenge ausmachte (Tyrosinmethode). Das Erscheinen von Peak I findet seine Erklärung in der immer noch vorhandenen Kontamination der Fibrinogenpräparationen mit nicht Fibrinogen-verwandtem Material, nicht adsorbierbaren Degradationsprodukten des Fibrinogens, in einer Überladung der Säule und einer zu kurzen Äquilibrierungszeit; bei Aufnahme geringerer Fibrinogenmengen läßt sich Peak I weitgehend vermeiden. Das Material des Peak II ist bei pH 7,6 durch Thrombin gerinnbar; die Brüchigkeit des Gerinnsels ist durch Alteration des Proteins durch das niedrige pH des Puffers B bedingt. Um auszuschließen, daß das Fibrinogen durch restliches Thrombin von der FM-ag-Präparation auf der Säule in Monomer umgewandelt worden ist und der Adsorptionsvorgang einem Gerinnungsprozeß gleichkommt, wurde das FM-ag dem TAME-Test unterzogen, dessen Nachweisgrenzen unter den gegebenen Bedingungen bis unter 0,08 NIH Einheiten Thrombin pro mg FM-ag Trockengewicht reichen. Darüberhinaus gab das in Peak II eluierte Fibrinogen nach Dialyse auf pH 7,6 und Konzentration auf 67 mg/100 ml keinen positiven Äthanoltest.

Fibrinogenspaltprodukte (Stadium II nach MARDER et al. 1967; 32,3 mg in 5,3 ml Auftragsvolumen) wurden ebenfalls an FM-ag adsorbiert (Abb. 7 unten). Wie spätere Versuche zeigen werden, ist die Adsorptionsfähigkeit der Spaltprodukte höheren Molekulargewichts größer als die niederen Molekulargewichts, die ohne adsorbiert zu werden in einem hohen Prozentsatz schon mit Puffer A in Peak I wieder eluiert werden.

Insbesondere aus Versuchen mit Radioisotopen ging hervor, daß geringe Proteinreste mit Puffer B nicht von der FM-ag - Säule eluiert werden. Eine vollständige Desorption und damit eine Wiederfindungsrate von 100% wurde mit 3 M Harnstoff bei pH 4,1 und auch pH 7,0 erreicht.

c. Diskussion der Ergebnisse

Für affinitätschromatographische Untersuchungen, die auf der Basis der spezifischen Adsorption von Proteinen an korrespondierende insolubilisierte Proteine bzw. an geeignete kleinmolekulare Substanzen arbeiten, ist Sepharose (Agarose = Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6 - Anhydro-L-Galactose) das am häufigsten benutzte Trägermaterial (PORATH et al. 1967; CUATRECASAS et al. 1968; KRISTIANSEN et al. 1969; GABEL, HOFSTEN 1970; PORATH, FORNSTEDT 1970; AXEN, ERNBACK 1971; BROCKWAY, CASTELLINO 1972; ZOLTON, MERTZ 1972). Sepharose besitzt so gut wie keine aktiven Gruppen, eine unspezifische Adsorption wird dadurch verhindert (CUATRECASAS et al. 1968). Die Grobporigkeit des Gels fördert eine möglichst freie Interaktion zwischen den reaktiven Gruppen des gekoppelten Materials und des gelösten Proteins. Eine kleinporige Matrix behindert die Adsorption; die Aktivitätsabnahme von gekoppelten Enzymen soll mehr durch räumliche Behinderung durch das Trägermaterial als durch sterische Veränderung des Enzyms infolge des Kopplungsvorgangs zustande kommen; Zwischenschaltung längerer Molekülketten zwischen Agarose und Protein erhöht die Adsorptionskapazität (PORATH et al. 1967; CUATRECASAS et al. 1968; AXEN, ERNBACK 1971). Dies macht verständlich, weshalb bei quantitativer Betrachtung der Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an FG-ag und FM-ag, wie sie im Folgenden dargestellt wird, nicht exakt die Verhältnisse der Komplexbildung unter in vivo-Bedingungen reflektiert sein müssen.

Das zu koppelnde Protein wird über nicht protonierte Aminogruppen an die Cyangruppen der aktivierten Agarose gebunden (CUATRECASAS et al. 1968; AXEN, ERNBACK 1971). Um die Zahl der Anheftungsstellen pro Fibrinogenmolekül an die aktivierte Sepharose zu reduzieren und so den Verlust an biologischer Aktivität durch mög-

liche sterische Veränderungen des Moleküls zu vermeiden (AXEN, ERNBÄCK 1971), wurde bei Präparation von FG-ag für die Untersuchungen mit einem Verhältnis von 1 : 1 eine möglichst hohe Relation von Fibrinogen zu aktivierter Agarose im Kopplungsansatz gewählt; obwohl schon bei 47,7 mg Fibrinogen pro 100 mg aktivierter Sepharose alle Cyangruppen blockiert zu sein schienen, fand erst bei einer Relation Fibrinogen : aktivierter Agarose von etwa 1,5 : 1 ein deutlicher Abfall der gekoppelten Fibrinogenmenge statt. Die Kopplungsbedingungen sind bei pH 7,5 bis pH 8,0 am günstigsten und entsprechen den Bedingungen von AXEN und ERNBÄCK (1971).

In die Pufferfolge zur Entfernung nicht gekoppelten Fibrinogens wird Glycin für die chemische Blockade evtl. noch vorhandener aktiver Cyangruppen eingeschaltet. Eine Ionenaustauscherfunktion und damit unspezifische Adsorption der im Alkalischen ionisierten Carboxylgruppe des Glycins wäre denkbar, fällt aber wegen der geringen Zahl restlicher blockierbarer freier Cyangruppen nicht ins Gewicht. Vergleichsuntersuchungen mit Äthanolamin, das KUDRYK et al. (1973) verwenden, gaben unter unseren Bedingungen keinen Unterschied.

Die Spezifität und die Zuverlässigkeit der Untersuchungen zur Komplexbildung mit FG-ag und FM-ag sind abhängig von der Qualität des verwendeten Fibrinogens. Neben nicht mit Fibrinogen verwandten Plasmaproteinen findet sich ein geringer Anteil von Degradationsprodukten und von Fibrinmonomer in den Fibrinogenpräparaten (BLOMBÄCK, BLOMBÄCK 1956; MOSESSON et al. 1967; ABILDGAARD 1971; MOSESSON et al. 1972). Die nicht erwünschte Adsorption durch vorhandenes Fibrinmonomer in FG-ag - Präparationen sowie durch unspezifische Adsorption (aktive Gruppen der Matrix, ionisiertes Glycin) muß im Versuch berücksichtigt werden. Die in allen üblichen Fibrinogenpräparationen vorhandene Plasminogen- und Faktor XIII-Kontamination erfordert den

Zusatz von Antifibrinolytica (Trasylo^R, EACA, STI) zu den verwendeten Puffern. Zur Vermeidung der Aktivierung von Faktor XIII ist bei Fehlen spezieller Inhibitoren das Arbeiten im calziumfreien Milieu notwendig.

Bei der Umwandlung von FG-ag in FM-ag durch Thrombin und Reptilase kam es darauf an, die durch diese Enzyme bedingte Aktivierung des Faktor XIII zu verhindern, der in inaktiver Form in der benutzten Fibrinogenpräparation enthalten ist. Eine Assoziation der Fibrinmonomere durch Quervernetzung hätte das Adsorptionsverhalten und die Adsorptionskapazität in nicht kontrollierbarer Weise beeinträchtigt bzw. modifiziert. Den calziumfreien Puffern wurde deshalb zusätzlich neben EDTA PCMB zugesetzt. PCMB blockiert reversibel freie SH-Gruppen, die für die Aktivität von Faktor XIII notwendig sind; eine Alteration des Fibrinogenmoleküls tritt nicht ein, da es keine freien SH-Gruppen enthält (SWIGERT et al. 1963; HENSCHEN 1964; BLOMBÄCK 1969b; BUDZYNSKI, STAHL 1969; SCHWARTZ et al. 1971b; DUDEK-WOJCIECHOWSKA et al. 1973a). Durch die nachfolgende Harnstoffbehandlung des FM-ag ist eine weitere Sicherung vor aktivem Faktor XIII gegeben, da das Enzym mit 3,3 M Harnstoff ohne Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit des Fibrinogens bzw. Fibrins irreversibel inhibiert wird (SCHWARTZ et al. 1970; SCHWARTZ et al. 1971b). Trasylo^R dient zur Inhibition der während der Inkubation mit Thrombin möglicherweise entstehenden Plasminaktivität.

FG-ag ist zu FM-ag unter Erhaltung der funktionellen Eigenschaften des Fibrins umzuwandeln: nach Thrombin- und Reptilaseeinwirkung wurde Glycin im Molekül N-terminal in einer Quantität endständig, wie sie für lösliches Fibrin der Fall ist (KUDRYK et al. 1974); unter dem Mikroskop waren FM-ag - Aggregate als Zeichen eines "Gerinnungsvorgangs" sichtbar; zum dritten trat die Fähigkeit zu Komplexbildung mit Fibrinogen und seinen Derivaten auf.

Die Waschvorgänge mit Harnstoff, Essigsäure und TAME dienten der Entfernung und Inaktivierung des Thrombins. Unter den gegebenen Bedingungen ist keine Denaturierung und Funktionsbeeinträchtigung des FM-ag durch Harnstoff und Essigsäure zu erwarten (MIHALYI 1950a; JOHNSON, MIHALYI 1965b; MIHALYI 1965; MÜLLER-BERGHAUS et al. 1971). Zur Ausschaltung der Restaktivität von Thrombin ist TAME geeignet (SHERRY, TROLL 1954). Nach Entfernen von TAME am Ende der FM-Präparation war keine Thrombinaktivität mehr vorhanden. Reptilase wird durch TAME nicht inhibiert (HARDER, STRAUB 1972). Nach den angegebenen zusätzlichen Waschvorgängen mit Essigsäure und Harnstoff war keine Reptilaseaktivität mehr nachweisbar.

Für den Adsorptionsvorgang wurde ein Puffer mit leicht alkalischem pH und physiologischer Ionenstärke gewählt (Puffer A), bei dem nach den Ergebnissen zahlreicher Autoren die besten Bedingungen für eine Komplexbildung gegeben sind. Die Zusätze von EDTA und Trasylol^R dienten wiederum der Vermeidung einer Faktor XIII- und Plasminaktivität. Bei einigen Versuchen wurde außerdem TAME zur Sicherung vor einer Thrombinrestaktivität zugesetzt; die Konzentration lag mit 0,001 M in einer Größenordnung, die auf die Aggregation von Fibrinogen und Fibrin keinen Einfluß mehr hat (TRIANAPHYLLOPOULOS 1961; ABILDGAARD, GODAL 1964). Der Elutionspuffer (Puffer B) mit gleichen Zusätzen wie Puffer A bei den Chromatographieversuchen lag unter dem isoelektrischen Punkt des Fibrinogens und Fibrins in einem Bereich, in dem keine Komplexbildung mehr zu erwarten ist und eine Gerinnung nicht mehr erfolgt (STEINER, LAKI 1952). Aus Vorversuchen ging hervor, daß ab einer Kochsalzkonzentration von 0,6 M eine Elution adsorbierten Materials erfolgte; es wurde aus diesem Grunde eine 1,0 M NaCl - Konzentration gewählt, die sämtliches adsorbierte Material bei angegebenem pH von der FG-ag - Säule löste. Von FM-ag ließen sich mit Puffer B geringe Mengen Restprotein einer Fibrinogen-

lösung nicht eluieren, die mit 3 - 6 M Harnstoff ablösbar waren. Möglicherweise haben die in einer Fibrinogenlösung vorhandenen Spuren von Fibrinmonomer eine höhere Affinität zu FM-ag als Fibrinogen.

2. Ein Verfahren zur Präparation und Trennung von Fibrinogenspaltprodukten

a. Einleitung

Sämtliche Fibrinogenpräparationen nach den in der Literatur angegebenen Standardverfahren sind außer mit Faktor XIII mehr oder weniger kontaminiert mit Plasminogen. Während Plasminogen in den hier durchgeführten Versuchen tolerabel ist, muß die Plasminaktivität, die zur Spaltproduktherstellung notwendig ist, am Ende der definierten Lyseperiode und während des Einsatzes der Lyseprodukte in den Versuch vollkommen ausgeschaltet werden. Sojabohnentrypsininhibitor (STI) und Trasylol^R finden zu diesem Zweck die häufigste Anwendung. Unter anderem für die im Folgenden dargestellten Versuche war es wünschenswert, zum einen über plasminfreie Spaltproduktpräparationen zu verfügen und zum zweiten die Kosten der Lyse durch Plasmin oder Streptase bei Präparation von Degradationsprodukten in großem Maßstab zu senken. Durch die von PORATH et al. (1967), GABEL, HOFSTEN (1970) und AXEN, ERNBACK (1971) beschriebene chemische Fixierung zahlreicher Enzyme an Agarose, wie sie im vorhergehenden Abschnitt für Fibrinogen adaptiert wurde, läßt sich dieses Ziel erreichen. Die Methode wurde in analoger Weise für die Insolubilisation von Plasmin angewendet und ist nachstehend dargestellt. Plasmin, welches nach den methodischen Angaben von BERNFIELD und WAN (1963) in Polyacrylamidgel inkorporiert wurde, ist von LATALLO et al. (1971) zur Fibrinogenolyse benutzt worden.

Im zweiten Teil dieses experimentellen Abschnitts wird ein Trennverfahren für die Spaltprodukte D und E vorgestellt, das auf den Untersuchungsergebnissen von PLOW und EDGINGTON (1972) zur Dissoziation des D:E-Komplexes mittels chaotroper Substanzen basiert. Die Separation der Lyseendprodukte stößt auf gewisse Schwierigkeiten, da FDP-D und FDP-E in einem nicht kovalent gebundenen Komplex vorliegen (BUDZYNSKI et al. 1967; GAFFNEY, DOBOS

1971; PLOW, EDGINGTON 1972). An Sephadex ist keine Trennung gelungen, obwohl man sie aufgrund der Molekulargewichtsdifferenzen erwarten sollte. Trennungen an DEAE-Cellulose, wie sie u.a. von NUSSENZWEIG et al. (1961a) angegeben wurden, haben auch in ihren Modifikationen den Nachteil der gegenseitigen Kontamination, so daß zusätzliche Reinigungsschritte notwendig sind (BUDZYNSKI et al. 1967; GORMSEN et al. 1972). Da Fragment D sich gegenüber Denaturierung ähnlich wie Fibrinogen verhält, welches zwischen pH 5,50 und 10,0 konformationsstabil ist, erscheint die Trennung an CM-Cellulose bei pH 3,5 zumindest problematisch (MIHALYI 1965; BUDZYNSKI et al. 1967; FURLAN, BECK 1972). Teilweise denaturiert wird das Endlysat auch durch die notwendige hohe Konzentrierung für die Pevikon-Block-Elektrophorese nach MARDER et al. (1969b) und durch das saure Milieu bei der Trennung über Sephadex G 100 mit 10%iger Essigsäure nach CARLUND et al. (1972b).

b.1) Herstellung und enzymatisches Verhalten von insolubilisiertem Plasmin

Das Vorgehen bei der chemischen Kopplung des Plasmins entsprach im Wesentlichen dem bei der Insolubilisation von Fibrinogen beschriebenen (MATTHIAS et al. 1974a). 500 mg mit Cyanbromid aktivierte Sepharose 6 B (auf Trockengewicht bezogen) wurden in 20 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,8 resuspendiert. Es wurden 25 Sgouris Einheiten Plasmin (Kabi, Stockholm, Schweden) entsprechend ca. 8 mg Protein in 5 ml des gleichen Puffers gelöst und zugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 16 - 18 Stunden bei 4°C unter Stickstoffatmosphäre wurde das insolubilisierete Plasmin im Chromatographierohr mit den oben bei der FG-ag - Herstellung angegebenen Puffern gewaschen (50 ml/h) mit den Ausnahmen, daß Puffer 5 in diesem Fall Puffer 1 entsprach und den Puffern kein EACA bzw. Trasylol^R zugesetzt wurde. Nach Absaugen über-

schüssigen Puffers war die Präparation verwendungsfähig.

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ist die Fixierung nahezu vollständig. Nur 3% der eingesetzten Plasminaktivität fanden sich nach der Kopplungsreaktion im Überstand (Fibrinplattenmethode). Die caseinolytische Aktivität des insolubilisierten Plasmins beträgt 30,2% der Aktivität des Enzyms in seiner löslichen Form; das Ergebnis ist entsprechend der 3% nicht gekoppelter Enzymaktivität korrigiert.

Für die Lysestudien zur Prüfung des Produkts wurde das insolubilisierte Plasmin in einer Fibrinogenlösung (Endkonzentration 450 mg/100 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,8) suspendiert und unter ständigem Rühren bei 37°C im Wasserbad gehalten. Die Substrat-Enzym-Relation betrug 1 mg Fibrinogen zu 0,05 Einheiten Plasmin auf der Basis der Aktivität des ungekoppelten Enzyms. Die Fibrinogenolyse wurde gestoppt entweder nur durch Abfiltrieren der Substratlösung oder durch Filtration und Trasylolzusatz (500 KIE/ml Digestionslösung).

Der Unterschied der fibrinogenolytischen Aktivität des löslichen und unlöslichen Plasmins ist in Abbildung 8 an dem Einfluß der Spaltprodukte auf die Thrombinzeit einer Fibrinogenlösung dargestellt. Die Aktivität des fixierten Plasmins (Kurven 2 - 5) ist im Vergleich zur löslichen Form erheblich reduziert, wie aus dem Ergebnis der Caseinspaltung zu erwarten war. Kurve 2 zeigt ein Experiment, in dem die Lyseprodukte zu den verschiedenen Zeiten vom insolubilisierten Plasmin abfiltriert wurden und Trasylol^R zugesetzt wurde. Kurve 3 zeigt den Lyseverlauf, nachdem das insolubilisierte Plasmin 4 Wochen bei 4°C in Phosphatpuffer gelagert worden war. In zwei weiteren Experimenten wurden die Thrombinzeiten gemessen, nachdem die Spaltprodukte vom insolubilisierten Plasmin abfiltriert worden waren und ohne Trasylolzusatz 3 Std. (Kurve 4) und 12 Std. (Kurve 5) bei Zimmertemperatur gestanden hatten, bevor die Thrombinzeit gemessen wurde.

Der identische Verlauf der Kurven 2 - 5 bedeutet, daß insolubilisiertes Plasmin seine Aktivität unverändert über Wochen behält und daß Plasmin durch Filtration vom Substrat getrennt werden kann, womit die Lyse unterbrochen ist.

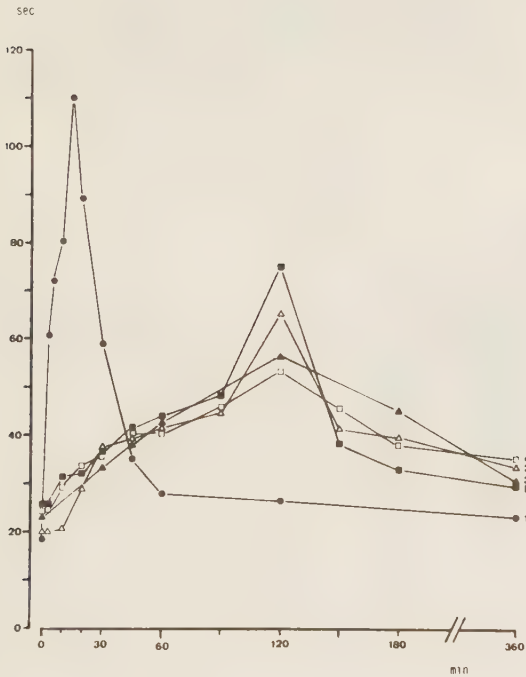


Abb. 8:

Verlängerung der Thrombinzeit (Ordinate, in Sekunden) einer Fibrinogenlösung durch Fibrinogenspaltprodukte im Verlauf der Lyse durch lösliches Plasmin (Kurve 1) und insolubilisiertes Plasmin (Kurven 2 - 5)

Die immunelektrophoretischen Bilder nach 60 Min. Lyse durch insolubilisiertes Plasmin sind identisch und zeigen ein beginnendes Lysestadium (Abb. 9). Bei Objektträger Nr. 2 wurde die Lyse mit Trasylol^R gestoppt, bei Nr. 3 wurde die Lyse mit insolubilisiertem Plasmin durchgeführt, das vier Wochen gelagert war; Lysestopp ebenfalls nach Filtration zusätzlich mit Trasylol^R. Bei Objektträger Nr. 4 wurde die Lyse nur durch Filtration unterbrochen. Bei Verwendung löslichen Plasmins ist die Lyse nach 60 Min. bis zu den Endprodukten D und E abgelaufen (Nr. 5). Objektträger Nr. 1 stellt Fibrinogen dar.



Abb. 9:

Immunelektrophorese von Fibrinogen (1) und Fibrinogenspaltprodukten nach 60 Min. Lyse durch insolubilisiertes (2 - 4) und lösliches Plasmin (5)

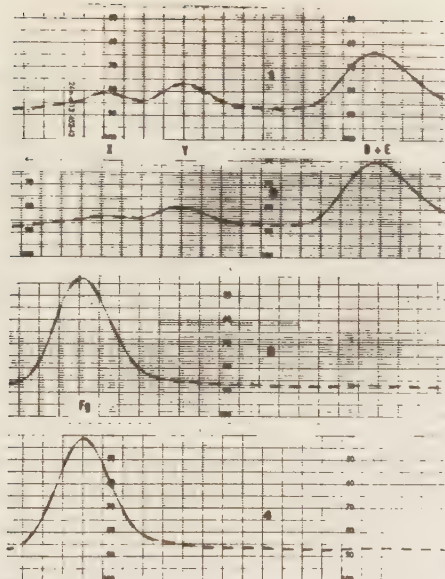


Abb. 10:

Elutionsdiagramm von Fibrinogenspaltprodukten nach Fibrinogenolyse von 15 Min. (Kurve 1) und 20 Min. (Kurve 2) durch lösliches Plasmin und durch insolubilisiertes Plasmin nach 15 Min. (Kurven 3 + 4)

Die Elutionsmuster der Fibrinogenspaltprodukte nach Chromatographie an Sephadex G 200 superfine (Säulenlänge 50 + 45 cm, Durchmesser 2,5 cm, Elutionsgeschwindigkeit 7,25 ml/h) nach Lyse mit löslichem Plasmin zeigt nach 15 Min. (Kurve 1) und 20 Min. (Kurve 2) ein fortgeschrittenes Stadium mit einem geringen Anteil von FDP-X (Peak I) und FDP-Y (Peak II) und einem großen Anteil von FDP-D+E (Peak III) (Abb. 10). Nach Lyse mit insolubilisiertem Plasmin ist erst ein viel früheres Stadium erreicht (Kurve 3: Lysestopp durch Filtration mit Trasylol^R; Kurve 4: Lysestoff durch Filtration ohne Trasylol^R; Lysezeit jeweils 15 Min.). Das Elutionsmuster nach 120 Min. Lyse ist in Abbildung 11 dargestellt. Lösliches Plasmin hat Fibrinogen bis zu den Endprodukten abgebaut (Kurve 1). Die Digestion mit insolubilisiertem Plasmin befindet sich noch in einem frühen Sta-

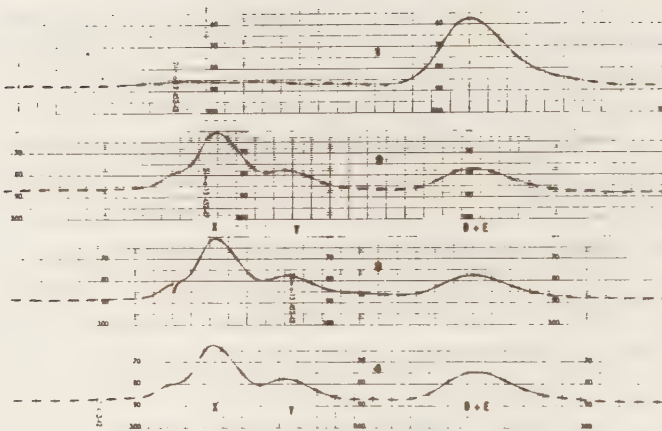


Abb. 11:

Elutionsdiagramm von Fibrinogenspaltprodukten nach 120 Min. Fibrinogenolyse durch lösliches (Kurve 1) und insolubilisiertes Plasmin (2 - 4)

dium und ist bei allen Versuchsvarianten identisch (Kurve 2: Lysestopp durch Filtration mit Trasylol^R; Kurve 3: insolubilisiertes Plasmin nach 4 Wochen Lagerung, Lysestopp durch Filtration und Trasylol^R; Kurve 4: Lysestopp durch Filtration ohne Trasylol, Probe vor Auftrag 12 Std. bei Zimmertemperatur gehalten).

b.2) Diskussion der Methode

Der Kopplungsvorgang von Plasmin an Sepharose hat zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms im Vergleich zu seiner löslichen Form geführt, der den Ergebnissen anderer Autoren entspricht und auf Konformationsänderung des Enzyms durch die Kopplung sowie auf reduzierter Möglichkeit zur Interaktion von Enzym und Substrat aufgrund räumlicher Behinderung durch die Gelmatrix beruht (PORATH et al. 1967; AXEN, ERNBACK 1971). Bei der Präparation von Spalt-

produkten insbesondere des Stadium II muß daher der vermögerte Lyseprozeß in Rechnung gestellt werden.

Insolubilisiertes Plasmin besitzt eine auffallende Lagerungsstabilität ohne weiteren Verlust der enzymatischen Aktivität. Da es nach Abschluß einer Reaktion quantitativ wiedergewonnen werden kann, ist insolubilisiertes Plasmin wiederholt über einen langen Zeitraum mit reproduzierbarer lytischer Aktivität einzusetzen. Die Kostenentwicklung ist erheblich, da Plasmin eingespart werden kann, Streptase und ein Antifibrinolyticum zum Lysestopp nicht mehr notwendig sind. Durch Trennung des Lysats vom insolubilisierten Enzym ist eine vollständige Unterbrechung der Reaktion ohne Inhibitor zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu erreichen. Dies konnte bewiesen werden durch identische Ergebnisse bei Vergleichsuntersuchungen mit und ohne Trasylolzusatz bei Beendigung der Lyse durch Abfiltrieren im Stadium II und mehrstündiges Stehenlassen des Lysats vor der Analyse.

Ein Vorteil ist das Präparationsverfahren, wenn Tieren zu Versuchszwecken Spaltprodukte infundiert werden sollen, ohne daß eine begleitende Plasminaktivität eine exogene Lyse induzieren darf und auf einen Inhibitor verzichtet werden soll, um die körpereigene fibrinogenolytische Aktivität nicht zu blockieren.

Das insolubilisierte Plasmin wurde bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Herstellung der Lyseendprodukte eingesetzt.

c.1) Verfahren zur Trennung der Lyseendprodukte

Eine 1%ige Fibrinogenlösung wurde nach oben beschriebenen Verfahren (Abschnitt b.1) bis zu den Endprodukten lysiert und gegen 0,025 M Tris-HCl, 0,025 M Trinatriumcitrat, 1,0 Kaliumiodid (KJ), 100 KIE Trasylol^R pro ml pH 7,4 dialysiert. Der Puffer entspricht dem von MARDER et al. (1969a) angegebenen und zur Trennung von FDP-X und FDP-Y verwendeten (s. Kapitel C.I) mit der Ausnahme, daß NaCl durch KJ ersetzt ist. Es wurden 15 - 17 ml entsprechend 150 - 170 mg Protein auf eine Säule (2,5 x 90 cm) mit gegen oben genanntem Puffer äquilibriertem Sephadex G 200 aufgetragen und mit 12 - 14 ml/h eluiert.

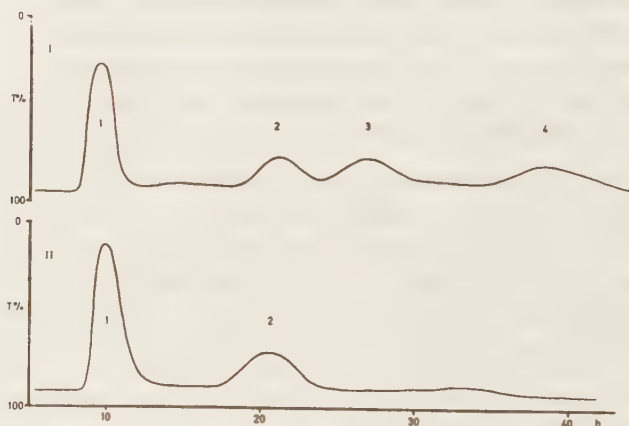


Abb. 12:

Elutionsdiagramm des Endlysats von Fibrinogen; nicht vorgereinigt (oben) und vorgereinigt (unten); Peak I = FDP-D; Peak II = FDP-E; Peak III + IV = Peptide

Es wurden vier Proteinpeaks eluiert (Abb. 12 oben). Nach Vorreinigung des Endlysats über G 200 mit dem Puffer nach MARDER et al. (1969a), welche restliche nicht voll

hydrolysierte Fragmente und einen Großteil der kleinen Spaltprodukte entfernt, FDP-D und FDP-E aber nicht entfernt, erschienen lediglich 2 Peaks (Abb. 12 unten). Nach dem Elutionsverhalten und den mengenmäßigen Anteilen sollte Peak I FDP-D und Peak II FDP-E entsprechen. Dies ließ sich diskoelektrophoretisch (Methode WEBER, OSWALD 1969; Abb. 13) und immunelektrophoretisch (Abb. 14) bestätigen. Die Molekulargewichte entsprachen den für FDP-D und FDP-E angegebenen und wurden mit 80.000 - 100.000 und 50.000 bestimmt. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit und die Immunreaktivität stimmten mit den für die Lyseendprodukte geforderten überein.

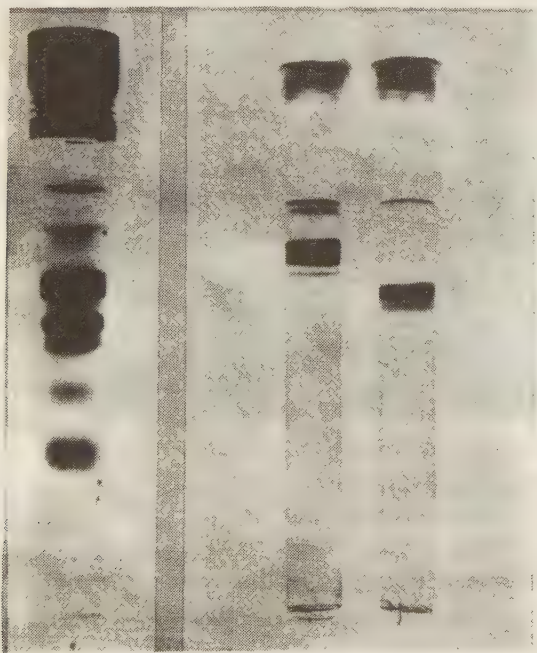


Abb. 13:

Diskoelektrophoretische Darstellung des Fibrinogenendprodukts vor Chromatographie (links) und von Peak I = FDP-D (Mitte) und Peak II = FDP-E (rechts) des Chromatogramms der Abb. 12 unten

Peak III hatte ein Molekulargewicht von etwa 13.000, Peak IV von unter 10.000; beide Fraktionen reagierten immunologisch nicht mit Anti-Fibrinogen, Anti-D- und Anti-E-Serum. Eine Kontamination von FDP-D und FDP-E war auch bei einmaliger Trennung nicht vorhanden.



Abb. 14:

Immunelektrophorese von Peak I = FDP-D (links)
und Peak II = FDP-E (rechts)

Die Thrombinzeit wurde bei Zusatz von FDP-E zu Plasma in einer der Fibrinkonzentration entsprechenden Konzentration um mehr als das Doppelte verlängert; nach Zusatz von FDP-D verlängerte sich die Thrombinzeit bei Erhöhung der FDP-D - Konzentration auf das Doppelte der im Plasma vorliegenden Fibrinogenkonzentration um 10%. Nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur in einem Puffer physio-

logischer Wasserstoffionenkonzentration und Ionenstärke, der kein KJ enthielt, fiel ein Teil des FDP-D aus.

c.2) Diskussion der Methode

Macromoleküle werden neben anderen Kräften durch nicht kovalente, apolare, hydrophobe Bindungen in ihrer Struktur gehalten. Diese Bindungen können dissoziieren nach Zusatz sogenannter chaotroper Ionen; parallel läuft ein Verlust der Nativität des Moleküls (DANDLIKER, DE SAUSSURE 1971). Nach den Untersuchungen von PLOW und EDGINGTON (1971, 1974) liegen die Lyseendprodukte FDP-D und FDP-E in einem Komplex vor, der ebenfalls über hydrophobe Bindungen zusammengehalten wird in einer räumlichen Anordnung, wie sie im Fibrinogenmolekül vorliegt. Dieser Komplex ließ sich mit KJ spalten. Die chaotrope Substanz KJ wurde hier erfolgreich zur chromatographischen Trennung von FDP-D+E eingesetzt. Es ließ sich eine saubere Trennung der Spaltprodukte erreichen, die den bisher angegebenen Methoden in ihrer Qualität überlegen ist.

Das Problem der Denaturierung der Moleküle während des Trennvorgangs ist auch mit diesem Verfahren nicht gelöst. Während FDP-E nach dem Trennvorgang in sogenannten physiologischen Puffern nicht ausfällt und eine starke anti-koagulatorische Potenz besitzt, ist FDP-D zumindestens teilweise einer Denaturation unterworfen, wie sie in der Instabilität in Pufferlösungen zum Ausdruck kommt. Für Studien an FDP-D, die nicht die biologische Aktivität zum Gegenstand haben, ist das Trennverfahren sehr gut geeignet. Durch Wahl geeigneter Ionen im Puffersystem sollte sich eine Trennung des D:E-Komplexes ohne wesentliche Denaturation von FDP-D erreichen lassen.

III. Versuche zum Adsorptionsverhalten von Fibrinogen und seinen Derivaten an insolubilisiertes Fibrinmonomer

1. Einleitung

Das Auftreten von Monomeren im Plasma mit und ohne nachfolgende Fibrino(-geno-)lyse führt zur Bildung von Komplexen, die die Monomere bis zu einer bestimmten Konzentration in Lösung halten. Im Verlauf einer Fibrino(-geno-)lyse haben die einzelnen Spaltprodukte, die in zeitlicher Folge entstehen und schließlich zu FDP-D und FDP-E abgebaut werden, einen unterschiedlich stark ausgeprägten antikoagulatorischen Effekt bei Zugabe zu Plasma, gemessen an der Verlängerung der Thrombinzeit. FDP-Y verlängert die Thrombinzeit im Gegensatz zu FDP-X und den Lyseendprodukten am deutlichsten. Mit dem in den vorangehenden Abschnitten entwickelten Verfahren zur Insolubilisierung von Fibrinogen und dessen Umwandlung in unlösliches Fibrinmonomer ist es in Zusammenhang mit der beschriebenen Methodik zur Spaltproduktherstellung möglich geworden, das Phänomen der Komplexbildung unter ganz neuen Bedingungen auf quantitativer Basis anzugehen und neue Einblicke in das Komplexbildungsverhalten der einzelnen Fibrinogenderivate zu erhalten.

Für die Untersuchungen in diesem Abschnitt war es einmal von Interesse, die Adsorptionskapazität einer bestimmten Menge von insolubiliisiertem Fibrinmonomer für Fibrinogen und die einzelnen Spaltprodukte zu ermitteln; zum zweiten sollte geprüft werden, welche Spaltprodukte zur Adsorption befähigt sind und in welchem Ausmaß, sowie in welchen mengenmäßigen Relationen zueinander eine Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an eine definierte Menge insolubiliisierten Fibrinmonomers erfolgt. Weiter sollte die Fähigkeit zur Komplexbildung von insolubiliisiertem Fibrinmonomer, dem durch Reptilasebehandlung nur Fibrinopeptid A fehlt, im Vergleich zu mit

Thrombin hergestelltem Monomer festgestellt werden. Schließlich wurde die Komplexbildungsfähigkeit bei unterschiedlichen Säure-Basen-Verhältnissen geprüft. Zur Aufklärung der gestellten Fragen wurden Chromatographie- und Inkubationsversuche von insolubilisiertem Fibrinmonomer mit Fibrinogen und den Spaltprodukten durchgeführt (MATTHIAS et al. 1973; MATTHIAS, HEENE 1973; MATTHIAS 1974a; MATTHIAS 1974b).

2. Chromatographieversuche:

Eine Säule von 0,9 cm Durchmesser wurde mit FM-ag entsprechend 400 mg Fibrinmonomer bis zu einer Höhe von 13 cm gefüllt und mit Puffer A äquilibriert. In 2 - 3 ml Puffer A wurden 15 mg Fibrinogen, die einzelnen isolierten Spaltprodukte, das gereinigte aber nicht in FDP-D und FDP-E getrennte Endlysat FDP-D+E und Albumin aufgetragen. Nach einer Reaktionszeit von 15 Min. wurde zur Entfernung nicht adsorbierten Materials mit Puffer A eluiert, gefolgt von Puffer B und/oder 0,05 M NaCl mit 6 M Harnstoff pH 7,0. Die Proteinmenge in den eluierten Peaks wurde photometrisch bei 280 nm gegen entsprechende Leerwerte gemessen. Die Ergebnisse sind jeweils Mittelwerte zweier Versuche.

Tabelle 3 läßt erkennen, daß Albumin nicht adsorbiert wird. Fibrinogen, FDP-X und FDP-Y werden zu einem hohen Prozentsatz und fast in gleichem Ausmaß adsorbiert. Zwischen 10% und 20% der aufgegebenen Menge werden mit dem Adsorptionspuffer A eluiert. Ungetrenntes FDP-D+E wird zu etwa 50% adsorbiert, wohingegen die über Pevikon separierten Spaltprodukte FDP-D und FDP-E mit 14% bzw. 6% erheblich geringer adsorbiert werden. Die Adsorption von FDP-D mit Essigsäure an Sephadex G 100 getrennt ist mit 4% noch weiter reduziert; FDP-E in gleicher Weise präpariert wird nicht mehr an FM-ag gebunden. Die biologische Aktivität ist noch vorhanden, wie sich an der Verlängerung

der Thrombinzeit zeigen läßt. Die in Tabelle 3 nicht aufgeführte Adsorption des Endlysats von quervernetztem Fibrin (fdp-d-Dimer+e) ist mit 64% höher als die von FDP-D+E.

Probe	Fg	X	Y	D / E	D _{pev}	D _{aa}	E _{pev}	E _{aa}	Albumin
% Protein nicht adsorbiert	16	8	18	56	94	113	98	98	112
% Protein adsorbiert, eluiert mit Harnstoff	74	78	92	49	14	4	6	0	0
recovery %	90	86	110	105	108	117	104	98	112

Tab. 3:

Adsorption von Fibrinogen, Fibrinogenspaltprodukten und Albumin an FM-ag; Säulenchromatographie;
D/E = ungetrennt; D_{pev}, E_{pev} = getrennt über Pevikon
Blockelektrophorese;
D_{aa}, E_{aa} = getrennt über Sephadex G 100, 10% Essigsäure

3. Inkubationsversuche zur Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinogen und Fibrinmonomer

a. Ausmaß und zeitlicher Verlauf der Adsorption an insolubilisiertes Fibrinmonomer induziert durch Thrombin (FM_t-ag)

FM-ag entsprechend 50 mg FM wurde in 25 ml Puffer A suspendiert, welcher Fibrinogen und die Spaltprodukte in einer Konzentration von 100 mg% enthielt; das Verhältnis von Fibrinmonomer zu gelöstem Protein betrug 2:1 auf Gewichtsbasis. Die Suspension wurde bei 23° - 25°C über 3 Stunden kontinuierlich auf dem Magnetrührer gerührt. Zu den in Abbildung 15 angegebenen Zeiten wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt und auf 100 ml Suspensionsmittel und 200 mg FM-ag bezogen dargestellt. Der Verdünnungseffekt durch die im feuchten Zustand eingewogene FM-ag wurde berücksichtigt.

Die Adsorption von Fibrinogen und FDP-X ist am größten und erfolgt über die gesamte Versuchsdauer. Sie ist unter diesen Versuchsbedingungen nach 3 Stunden im Wesentlichen abgeschlossen, nach weiteren 2 Stunden findet sich nur noch eine geringfügige zusätzliche Adsorption. Insgesamt werden etwa 60 mg Fibrinogen und FDP-X an 200 mg FM-ag adsorbiert. Die Adsorption von FDP-Y und nicht getrenntem FDP-D+E ist mit etwa 25 mg an 200 mg FM-ag geringer; der Gleichgewichtszustand der Reaktion ist hier nach etwa 1/2 bis 1 Stunde erreicht. Die Adsorption von FDP-D und insbesondere von FDP-E, die hier über Pevikon-Block-Elektrophorese getrennt wurden, ist, wie auch aus den Chromatographieversuchen hervorgeht, wiederum geringer als die der ungetrennten Lyseendprodukte.

Die Daten sind zusammengefaßt in Tabelle 4. Der untere Teil der Tabelle (FM-ag) gibt die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse mit Fibrinmonomer wieder, die nach

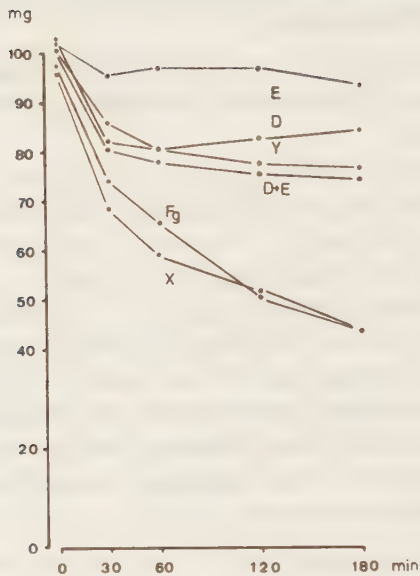


Abb. 15:

Verlauf und Ausmaß der Adsorption von Fibrinogen und Fibrinogenspaltprodukten an FM-ag;
FM-ag: 200 mg Protein; FG- und FDP-Konzentration: 100 mg/100 ml; Zahl der Experimente: max. n = 11; min. n = 4

3-stündiger Versuchsdauer sämtlich einen signifikanten Unterschied zu den Ausgangswerten zeigen (Fibrinogen, FDP-X, FDP-Y, FDP-D+E: $p < 0,01$; FDP-D, FDP-E: $p < 0,05$). Der obere Teil der Tabelle (FG-ag) stellt als Kontrolle die Ergebnisse der Adsorptionsversuche mit insolubiliisiertem Fibrinogen als Substrat dar. Am Versuchsende hat zwar eine geringe, aber nicht signifikante Adsorption an FG-ag stattgefunden.

Fg - ag

min	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
0	99,49	2,91	99,76	4,56	101,19	5,13	102,33	0,44	104,09	105,33
30	93,69	6,37	87,11	8,90	88,26	9,07	93,30	2,39	100,00	97,52
60	94,26	9,80	88,31	7,20	90,51	6,15	91,64	0,04	100,24	101,76
120	87,53	6,32	94,23	5,08	93,21	6,37	95,83	3,53	96,46	98,30
180	86,76	6,38	91,85	6,80	92,44	4,89	96,29	2,88	92,22	98,15
	Fg		X		Y		D+E		D	E

FM - ag

min.	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
0	97,32	4,08	95,96	1,99	100,99	3,49	100,78	2,06	103,03	3,54	102,25	2,38
30	74,28	9,73	68,64	6,15	86,51	5,80	80,63	5,86	82,25	0,74	95,20	2,27
60	65,06	9,46	59,39	9,97	80,44	4,89	77,79	3,17	80,66	2,33	96,78	1,38
120	50,05	8,06	51,71	6,39	77,75	4,13	75,35	6,38	82,48	3,34	96,78	4,50
180	43,80	9,82	43,70	4,08	76,63	2,12	74,23	5,55	84,31	2,17	92,94	2,27
	Fg		X		Y		D+E		D		E	

Tab. 4:

Verlauf und Ausmaß der Adsorption von Fibrinogen und Fibrinogenspaltprodukten an FG-ag und FM-ag.
Versuchsbedingungen wie bei Abb. 15

mg FG mg adsorbiert an 100 mg FM-ag mg FDP-X
in 50 ml Puffer A

	Fg	FDP-X	
394,6	137,2	-	-
99,6	66,6	44,7	101,08
49,8	40,5	28,7	50,2

Tab. 5:

Adsorptionskapazität von 100 mg FM-ag (Trockengewicht) bei steigender Konzentration von FG und FDP-X

Tabelle 5 zeigt, daß unter gleichen Versuchsbedingungen eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Ansatz - hier dargestellt für Fibrinogen und FDP-X - zu einer signifikanten Zunahme der Adsorption ($p < 0,01$) an 100 mg insolubilisiertes Fibrinmonomer nach 3 Stunden Versuchsdauer führt.

b. Vergleichende Studien zur Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinmonomer, induziert durch Reptilase (FM_r -ag) und Thrombin (FM_t -ag)

Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie die unter Absatz 3.a. dieses Abschnitts beschriebenen. Der Abfall der Konzentration im Überstand wurde für Fibrinogen, FDP-X, FDP-Y und für die an Sephadex G 200 gereinigten, aber nicht separierten Lyseendprodukte FDP-D+E nach 30 Minuten und nach 3 Stunden gemessen. Nach 3 Stunden war, wie oben erwähnt, das System äquilibriert. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Adsorption an FM_r -ag und FM_t -ag dargestellt. Die Adsorption an FG-ag dient, wie in den vorangehenden Versuchen, als Kontrolle. Über den einzelnen Säulen sind die Ausgangskonzentrationen im Versuchsansatz zu Zeitpunkt 0 angegeben.

Eine Adsorption von Fibrinogen und seinen Derivaten findet nicht nur an FM_t -ag statt ($p < 0,01$ nach 3 Std. für alle Proteine), sondern auch an FM_r -ag ($p < 0,05$ nach 3 Std. für alle Proteine), wobei die Komplexbildung mit FM_r -ag für alle Komponenten von geringerem Ausmaß ist. Fibrinogen und FDP-X werden sowohl an FM_t -ag wie auch an FM_r -ag am stärksten adsorbiert. Die Adsorption von FDP-Y und FDP-D+E ist jeweils geringer, hat aber für beide Komponenten etwa das gleiche Ausmaß. Eine geringe Affinität besteht auch zu FG-ag. Die Unterschiede der Adsorption an FG-ag und FM_r -ag sind nach 3 Stunden für alle Komponenten mit Ausnahme von FDP-Y signifikant ($p < 0,05$). Die Differenzen in der Adsorption bei FG-ag

und FM_r -ag in Bezug auf FM_t -ag sind ebenfalls signifikant ($p < 0,01$). Eine Adsorption von Albumin lässt sich nicht feststellen.

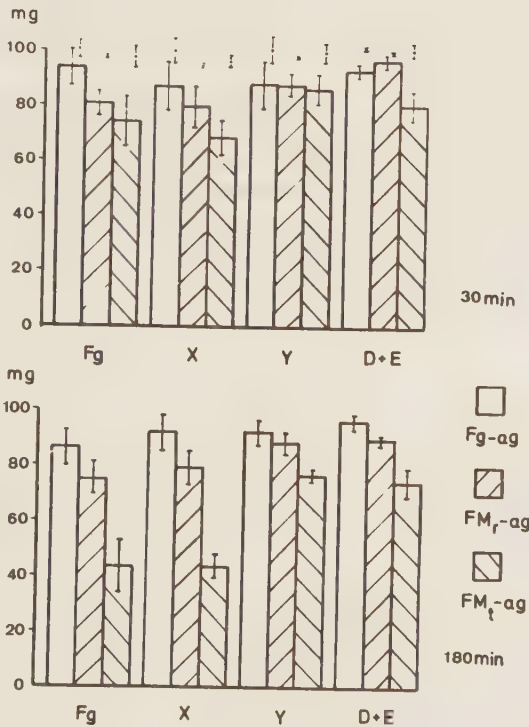


Abb. 16:

Adsorption von Fibrinogen und Fibrinogenspaltprodukten an insolubilisiertes Fibrinogen (FG-ag) und insolubilisiertes Fibrinmonomer induziert durch Reptilase (FM_r -ag) und Thrombin (FM_t -ag).

Versuchsbedingungen wie bei Abb. 15

c. Adsorption von Fibrinogen und seinen Derivaten an insolubilisiertes Fibrinmonomer (FM_t -ag) bei unterschiedlichen Säure-Basen-Verhältnissen

Die experimentellen Voraussetzungen waren, abgesehen von kleinen Modifikationen, prinzipiell die gleichen wie in den vorhergehenden Abschnitten. Es wurde FM_t -ag entsprechend 100 mg Protein in 25 ml einer 100 mg%igen Lösung von Fibrinogen und seinen Derivaten in Puffer A, der zusätzlich 0,001 M TAME enthielt, suspendiert; das entspricht einer Gewichtsrelation von 4 : 1 zwischen Fibrinmonomer und löslichem Protein. Nach 3 Stunden wurde aus dem Konzentrationsabfall der einzelnen Komponenten die absolut an 100 mg FM_t -ag adsorbierte Proteinmenge errechnet und in Abbildung 17 dargestellt.

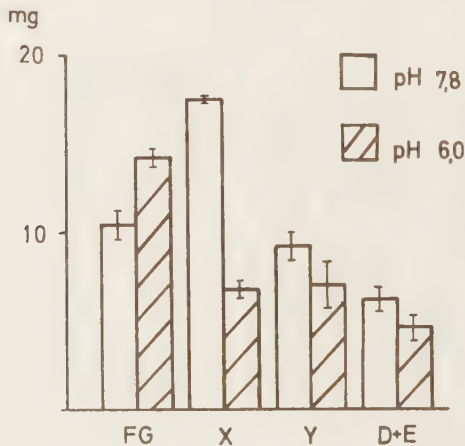


Abb. 17:

Adsorption von FG und FDP an FM -ag bei pH 7,8 und pH 6,0; FM -ag: 100 mg Protein; FG- und FDP-Lösung: 25 mg/25 ml Puffer; Inkubationszeit 3 Std.; Zahl der Experimente: $n = 5$

Es zeigt sich erneut, daß Fibrinogen und FDP-X bei pH 7,8 in höherem Grade adsorbiert werden als die kleineren Fragmente FDP-Y und FDP-D+E. Bei pH 6,0 tritt eine signifikante Abnahme der Adsorption der Fibrinogenspaltprodukte an FM_t-ag ein (FDP-X, FDP-D+E: $p < 0,01$; FDP-Y: $p < 0,05$). Dagegen läßt sich als besonders Phänomen für Fibrinogen beim Wechsel des pH von 7,8 auf 6,0 eine signifikante Adsorptionszunahme feststellen ($p < 0,01$).

4. Diskussion der Ergebnisse

Sinn dieser Untersuchungen war es, Auskunft darüber zu erhalten, welche der Fibrinogenspaltprodukte außer dem Fibrinogen selbst zur Adsorption an FM-ag in der Lage sind und in welchem Ausmaß die einzelnen Komponenten unter verschiedenen Bedingungen adsorbiert werden, um daraus Folgerungen über die Polymerisationsorte und die Struktur der Moleküle ableiten zu können.

Eine nicht signifikante geringe Adsorption findet schon an FG-ag statt; sie ist auf eine spezifische Adsorption infolge primärer Alteration des Fibrinogens mit geringem Monomeranteil oder auf unspezifische Kräfte zurückzuführen. Der Verdünnungseffekt durch den Feuchtigkeitsgehalt der suspendierten FG-ag bzw. FM-ag ist, wie erwähnt, mit ca. 3% bei allen Versuchen berücksichtigt.

Bei Vergleich von FM_r-ag und FM_t-ag mit FG-ag läßt sich mit Verlust von Fibrinopeptid "A" für alle untersuchten Substanzen eine Adsorption feststellen, die nach Fibrinopeptid B - Abspaltung zunimmt. Wenn man davon ausgeht, daß der Adsorptions- bzw. Komplexbildungsvorgang analog dem Phänomen der Polymerisation zu interpretieren ist und nicht zusätzlich durch andere Kräfte wie z.B. durch Ladungsänderungen der Spaltproduktmoleküle infolge der Abspaltung positiv geladener Bruchstücke der α -Kette während der Lyse modifiziert wird, wie es von NANNINGA und GUEST (1967) in Erwägung gezogen wurde, so läßt sich sagen, daß, wie bei der Fibrinpolymerisation, auch bei

der Komplexbildung mit der Fibrinopeptid A - Abspaltung erste Adhäsionsorte freigelegt werden und mit Fibrinopeptid B - Verlust weitere hinzukommen (BLOMBÄCK 1972). Die Insolubilisierung hat nach diesen Befunden die postulierte Konformationsänderung des Moleküls nicht entscheidend beeinflußt. Dies konnte durch das im Folgenden dargestellte Ergebnis der Reduktion von FG-ag erhärtet werden, welches nur eine Fixation der α -Kette an Agarose erkennen ließ. Bei zunehmender Bewegungseinschränkung der α -Kette ist eine fortbestehende Beweglichkeit der anderen Ketten möglich.

Die Zunahme der Adsorption beim Übergang von FM_R -ag zu FM_t -ag findet sich auch noch bei FDP-D+E. Eine zusätzliche Verfügbarkeit von Polymerisationsorten auf dem Fibrinmolekül setzt das Vorhandensein weiterer korrespondierender Areale auf dem Spaltproduktmolekül voraus. Die Spaltprodukte des Endlysats FDP-D+E sollten demnach trotz der maximalen Kettenverkürzung mit Verlust von Polymerisationszentren und der Gerinnungsfähigkeit noch über einen ausreichenden Besatz an reaktionsfähigen Arealen verfügen, die mit den im FM_R -ag freigelegten und den bei Übergang zu FM_t -ag hinzukommenden Zentren in Beziehung treten können.

In ersten Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß fdp-d-Dimer an FM_t -ag adsorbiert wird. Wenn man den Überlegungen von DOOLITTLE et al. (1972) folgt, daß die Orte der beginnenden Polymerisation und der Quervernetzung im C-terminalen Bereich der γ -Ketten räumlich nahe beieinander liegen und beide Prozesse im Beginn der Gerinnung zeitlich parallel ablaufen, so kann man unterstellen, daß zumindest ein Teil der Polymerisationszentren im fdp-d-Dimer durch den gegenseitigen Bezug der korrespondierenden fdp-d Moleküle im Dimer blockiert sein sollte. Die trotzdem erfolgende Adsorption an FM_t -ag spricht für zusätzliche Polymerisationszentren in den fdp-d-Fragmenten, die mit dem N-terminalen Bereich des

FM_t-ag in Beziehung treten. Dies ist in Übereinstimmung mit den Vorstellungen von BELITSER et al. (1973) und KUDRYK et al. (1974) über die Polymerisationszentren. Im Einklang dazu sind auch die Befunde von DUDEK-WOJCIECHOWSKA et al. (1973b), die auf molarer Basis eine gleiche antikoagulatorische Potenz von fdp-d-Dimer und FDP-D fanden, entsprechend einer halben antikoagulatorischen Aktivität von fdp-d-Dimer im Vergleich zu FDP-D auf Gewichtsbasis.

Im Endstadium der Fibrinogenolyse (nicht der Lyse von unlöslichem Fibrin) ist die γ -Kette (MG 47.000) von FDP-D von C-terminal über die γ' -Kette (MG 42.000) bis zur γ'' -Kette (MG 37.000) und γ''' -Kette (MG 27.000) mit Verlust der Möglichkeit zur γ - γ' -Dimerenbildung abgebaut (PIZZO et al. 1973b). Mit dem Verlust der Quervernetzungsorte sollten nach DOOLITTLE et al. (1972) und GAFFNEY und DOBOS (1971) auch die Polymerisationsstellen reduziert sein. Da eine Adsorption von FDP-D auch nach maximaler Lyse an FM_t-ag jedoch erfolgt, müssen weitere Polymerisationszentren in anderen Molekülarealen von FDP-D vorliegen, wenn man davon ausgeht, daß im Endlysat keine intakten γ - oder γ' -Ketten mehr vorliegen.

Obwohl die Komplexbildungskapazität von FM_r-ag geringer ist als die von FM_t-ag, fand KOWALSKI (1969) bei Mischung von Spaltprodukten mit Reptilasemonomer und mit Thrombinmonomer unter sonst identischen Bedingungen nach Gerinnung mehr Reptilasemonomer-Spaltproduktkomplexe im Überstand als Thrombinmonomer-Spaltproduktkomplexe. Die Ursache könnte sein, daß die Polymerisationsfähigkeit bei ausschließlicher Fibrinopeptid A - Verlust noch reduziert ist und darüberhinaus durch Spaltprodukte effektvoller inhibiert wird als bei Thrombinmonomer.

Der Komplexbildungsvorgang ist ein Prozeß, der sich erst nach mehreren Stunden im Gleichgewichtszustand befindet. Die adsorbierte Proteinmenge kann durch Erhöhung der

Konzentration im Suspensionsmedium ebenfalls erhöht werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden, daß bei steigender Konzentration von FDP-D im Fibrinogen-Spaltproduktansatz als Ausdruck zunehmender Komplexbildung die Defektpolymerisation zunimmt (BANG et al. 1962), sich die Thrombinzeit verlängert (LARRIEU et al. 1972) und die α -Polymerenbildung abnimmt (PIZZO et al. 1973b).

Auf Gewichtsbasis ist mit abnehmender Molekülgröße der Proteine eine abnehmende Adsorption erkennbar. Unter Zugrundelegung eines Molekulargewichts des Fibrinogens von 330.000 und des D:E-Komplexes von 130.000 (PLOW, EDGINGTON 1972 und 1974) und der von MARDER et al. (1969a) angegebenen Molekulargewichte für die übrigen Fibrinogen-spaltprodukte (X: 240.000; Y: 155.000; D: 85.000; E: 50.000) steigt die molare Ausgangskonzentration im Inkubationsansatz im Vergleich zu Fibrinogen - als 1 gesetzt - mit abnehmender Molekülgröße der Spaltprodukte auf 6,63 für FDP-E an. Die adsorbierte Menge bewegt sich auf molarer Basis gerechnet für alle Proteine im Vergleich zu Fibrinogen zwischen 1 und 1,38, ist also praktisch mit der adsorbierten Fibrinogenmenge identisch. Das bedeutet, daß mit abnehmender Molekülgröße und Verlust von Polymerisationszentren die Affinität zu FM_t -ag verloren geht. Bei etwa gleichem Molekulargewicht ist bei FDP-Y und FDP-D+E die Adsorption auf molarer und Gewichtsbasis gleich. Das bedeutet, daß beide Fragmente trotz der abnehmenden Kettenlänge im D-Anteil von FDP-D+E über eine etwa vergleichbare Potenz der Polymerisationszentren und über eine vergleichbare sterische Konformation verfügen sollten. Offensichtlich sind bei den Chromatographieversuchen unter Elutionsbedingungen, bei denen das Monomer des FM_t -ag das über 20fache der angegebenen Spaltprodukte beträgt, andere Adsorptionsbedingungen als bei den besser reproduzierbaren Inkubationsversuchen gegeben, da die adsorbierten Anteile für Fibrinogen, FDP-X und FDP-Y nahezu gleich sind, während FDP-D+E

im Vergleich zu FDP-Y deutlich weniger adsorbiert wird. Nach den Untersuchungen von PLOW und EDGINGTON (1972, 1974) liegen FDP-D und FDP-E als D:E-Komplex mit einer dem Fibrinogen ähnlichen Konfiguration vor; FDP-Y enthält ebenfalls ein D und ein E, allerdings in noch kovalent gebundener Form. Separiertes FDP-D und FDP-E sollen sich bei Zusammengeben in äquimolaren Mengen erneut zum D:E-Komplex rekonstituieren (PLOW, EDGINGTON 1974).

KUDRYK et al. (1973, 1974) haben entgegen den hier dargestellten Befunden bei ihren Chromatographieversuchen mit Aufgabe des Endlysats keine Adsorption von FDP-E an FM_t -ag gefunden. Das würde bedeuten, daß der D:E-Komplex, der in neutralen Puffern selbst bei hohen Kochsalzkonzentrationen nicht trennbar ist, durch den Adsorptionsvorgang vollständig spaltbar wäre unter Elution von FDP-E mit dem Puffer A und Adsorption von FDP-D, welches mit Puffer B eluierbar ist. Die Adsorptionskräfte zwischen FM_t -ag und FDP-D wären damit intensiver als die hydrophoben Bindungen des D:E-Komplexes, wenn man voraussetzt, daß sämtliches FDP-D und FDP-E als D:E-Komplex vorliegt. Dies erscheint unwahrscheinlich, obwohl das Problem letztlich noch offen bleiben muß.

Für die hier gefundene Adsorption von FDP-E an FM_t -ag spricht weiterhin, daß eine Adsorption von FDP-D an insolubilisierten N-DSK nach Thrombineinwirkung gefunden wurde (KUDRYK et al. 1974). N-DSK ist partiell mit FDP-E identisch. FDP-E hat eine längere α - und β -Kette als der N-DSK, dagegen eine kürzere γ -Kette C-terminal und eine kürzere β -Kette N-terminal mit Verlust von Fibrinopeptid B (KOWALSKA-LOTH et al. 1973). Wenn man zusätzlich zu dem Fibrinopeptid B - Verlust den von einigen Autoren beschriebenen Fibrinopeptid A - Verlust von FDP-E in Rechnung stellt (DUDEK et al. 1970; MILLS 1972; PIZZO et al. 1972b; KOWALSKA-LOTH et al. 1973; MOSESSON et al. 1973b), so ist eine Adsorption von FDP-E im D-

Bereich von FM_t -ag analog der beschriebenen Adsorption von FDP-D an insolubilisierten N-DSK nach Thrombineinwirkung durchaus wahrscheinlich. Während SMITH und BANG (1972) bei früheren Versuchen mittels Gelchromatographie keinen Hinweis für eine Komplexbildung zwischen Fibrinmonomer und FDP-D und FDP-E feststellen konnten, nehmen BANG et al. (1973) neuerdings Komplexe zwischen Monomer und fdp-d und fdp-e an.

Auffallend ist bei den Chromatographieversuchen im Vergleich zur Adsorption von FDP-D+E der deutliche Abfall in der Adsorption von FDP-D getrennt über Pevikon und der noch stärkere Adsorptionsverlust von FDP-D getrennt über Sephadex G 100 mit Essigsäure. Die Erklärung kann nur darin liegen, daß der Trennvorgang zu einer Denaturierung des Moleküls mit Teilverlust spezifischer Polymerisationsareale geführt hat, welche durch Essigsäure intensiver ist als nach Pevikon-Elektrophorese. Gleiches trifft für FDP-E zu, das nach Essigsäuretrennung nicht mehr adsorbiert wird.

Bei fallendem pH-Wert nimmt die Affinität der Spaltprodukte zu FM_t -ag ab, der Komplex dissoziiert im sauren Milieu. Die Inhibitorfunktion der Spaltprodukte auf die Polymerisation der Fibrinmonomere läßt nach, die Gerinnungsbildung wird begünstigt. Im pH-Bereich um 6 liegt das Optimum der Assoziation der Monomere (BLOMBÄCK, LAURENT 1958; LATALLO et al. 1962a; BELITSER et al. 1968).

Das Phänomen der verminderten Fähigkeit zur Komplexbildung zwischen Monomer und Spaltprodukten ist von zahlreichen Autoren beobachtet worden. BUDZYNSKI et al. (1963) fanden keine typische Verlängerung der Thrombinzeit mehr nach Zugabe von Lyseprodukten zu einem Gerinnungssystem bei pH 6,5 im Vergleich zu pH 7,6. LARRIEU et al. (1966) konstatierten eine verminderte Polymerisationshemmung durch die Spaltprodukte - insbesondere von FDP-D - bei pH 6,2 im Gegensatz zu pH 7,8. FDP-E

beeinflusste den Polymerisationsvorgang nicht. WEGRZYNO-WICZ et al. (1971) inkubierten Plasmaproben mit konstanten Mengen von Fibrinogenspaltprodukten und radioaktivem Fibrinmonomer bei unterschiedlichem pH. Nach Gerinnung der Probe nahm bei niedrigerem pH das Monomer im Überstand ab, das heißt, die Fähigkeit der Spaltprodukte zur Bildung löslicher Komplexe mit Monomer war reduziert. LY und ARNESEN (1972) und ARNESEN et al. (1973) beobachteten bei Zusatz von frühen Spaltprodukten zu Plasmaproben nach Gerinnung bei pH 6,7 bzw. 6,3 ebenfalls einen Abfall des noch im Überstand gelösten Monomers im Vergleich zu pH 8,0 bzw. 7,8. Dieses Gerinnsel war überdies ärmer an inkorporierten Spaltprodukten, die Konzentration im Überstand hatte zugenommen. Der umgekehrte Effekt trat bei pH-Erhöhung ein: das Gerinnsel als Ganzes nahm ab, die inkorporierte Spaltproduktmenge nahm zu, die in komplexer Form gelösten Monomere im Überstand nahmen ebenfalls zu. Die Komplexbildung war bei pH 7,8 - 8,0 also insgesamt erhöht, sowohl im Gerinnsel als auch im Überstand.

Interessant ist das entgegengesetzte Verhalten von Fibrinogen bei der Komplexbildung mit FM_t -ag mit Zunahme der Adsorption bei pH 6,0. Der Mechanismus der Assoziation zwischen FM_t -ag und Fibrinogen scheint gegenüber dem der Adsorption zwischen FM_t -ag und Spaltprodukten modifiziert zu sein. Fibrinogen steht nach diesen Befunden in seinem Verhalten dem Fibrinmonomer mit seinem Polymerisationsoptimum um pH 6,0 näher als seinen Spaltprodukten. Die dem Monomer näher kommende elektrische Ladung und Ladungsverteilung mag zu dieser Zunahme der Adsorption von Fibrinogen an FM_t -ag bei pH 6,0 führen.

Die Spaltprodukte sind durch Verlust positiv geladener Molekülteile in den negativen Ladungsbereich verschoben (NANNINGA, GUEST 1967; TRIANTAPHYLLOPOULOS, TORRES 1971). Nach Untersuchungen von BELITSER et al. (1968) inhibiert Fibrinogen die Polymerisation von Monomer bei pH 6,8, es

hat keinen Einfluß bei pH 6,0 und fördert sie bei pH 5,7. Der Effekt wird bezogen auf die Aggregationstendenz des Fibrinogens bei niederem pH. Trotz geringerer Adsorption an Fibrinmonomer ist also ein größerer antikoagulatorischer Effekt der Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplexe bei höherem pH zu erwarten.

Da bei Acidose die Gerinnungstendenz ganz allgemein erhöht ist (HARDAWAY 1965), hat das für die Verhältnisse in vivo die Konsequenz, daß bei Schockzuständen mit Acidose und gesteigertem Umsatz an Gerinnungsfaktoren die Wasserstoffionenkonzentration in den physiologischen Bereich gebracht werden sollte. Dadurch wird die Polymerisationstendenz der zirkulierenden Fibrinmonomere reduziert und die antikoagulatorische Potenz der Spaltprodukte erhöht. Die Gefahr einer disseminierten intravasculären Gerinnung kann vermindert werden.

IV. Reduktion von insolubilisiertem Fibrinogen

1. Einleitung

Wie im Vorigen gezeigt werden konnte, geht durch den chemischen Vorgang der Insolubilisation die biologische Aktivität des Moleküls in bezug auf die Umwandlung in Fibrinmonomer und die Fähigkeit zur Komplexbildung mit Fibrinogen und seinen Derivaten nicht verloren. Es kann deshalb angenommen werden, daß die Polymerisationszentren von FG-ag und FM-ag durch die Fixation an Agarose nicht blockiert worden sind. Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen haben zum Ziel, Aufschluß über den Ort der chemischen Fixation im Fibrinogenmolekül zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde unlösliches Fibrinogen (FG-ag) und zum Vergleich lösliches Fibrinogen zur Trennung der Ketten reduziert und diskelektrophoretisch untersucht (MATTHIAS et al. 1974b). Aus der Kenntnis der Ketten, die nach Reduktion von FG-ag unlöslich an Agarose fixiert bleiben, sollten sich Informationen über die Fibrinogenstruktur im Hinblick auf die Lage der Ketten zueinander und die Position der Polymerisationszentren gewinnen lassen.

2. Methodik und Ergebnisse:

Humanfibrinogen wurde im Verhältnis 1 : 1 (w/w Trockengewicht) an Agarose gekoppelt. 1,0 g feuchtes FG-ag entsprechend 130 mg Trockengewicht bzw. 65 mg Fibrinogen wurden suspendiert in 1,0 ml destilliertem Wasser, 1,0 g Harnstoff, 0,5 ml Natriumdodecylsulfat (SDS) 4%, 0,5 ml Mercaptoäthanol 4%, 0,2 ml 0,4 M Tris- H_3PO_4 pH 6,8, über 10 Min. bei 60°C inkubiert und 12 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Überstand (930 mg%ige Proteinlösung) wurde etwa 5fach mit 0,05 M Tris- H_3PO_4 pH 6,8, 8 M Harnstoff, 20%iger Saccharose und 0,1% SDS auf eine Proteinkonzentration von 200 mg% verdünnt. 20 - 40 μl wurden zur Diskelektrophorese aufgetragen (SWANK, MUNKRES

1971). Lösliches Fibrinogen vergleichbarer Konzentration wurde in gleicher Weise behandelt und diente als Referenz zur Kettenidentifikation.



Abb. 18:

Diskelektrophoretische Darstellung der Ketten von reduziertem Fibrinogen (links) und der Ketten im Überstand nach Reduktion von insolubilisiertem Fibrinogen (rechts)

Abbildung 18 zeigt die Trennung der Ketten des löslichen Fibrinogens (links) sowie der Ketten, die nach Reduktion von FG-ag als gelöste Proteine in den Überstand des Reaktionsansatzes getreten sind. Während beim löslichen Fibrinogen alle drei Ketten in typischer Weise etwa gleich stark in Erscheinung treten, fehlt nach Reduktion von FG-ag die ("A") α -Kette fast vollständig, während die (B) β - und γ -Kette deutlich in gleicher Farbintensität zur Darstellung kommen.

3. Diskussion

Nach den in Abschnitt B.2 (Gerinnung) referierten Vorstellungen setzt die Fibrinopeptid "A" - Abspaltung mit einer Konformationsänderung des Moleküls ein, die nach Fibrinopeptid B - Verlust fortschreiten soll und sämtliche verfügbaren Polymerisationszentren freilegt. Da FG-ag durch Reptilase und Thrombin in FM-ag zu transformieren ist und entsprechend der Fibrinopeptidabspaltung im Sinne der Komplexbildung zu zunehmender Adsorption von Fibrinogen und seinen Derivaten befähigt wird, läßt sich folgern, daß Fibrinogen auch in chemisch an Agarose fixierter Form zu der postulierten spezifischen Konformationsänderung mit Freilegung von Polymerisationszentren in der Lage ist.

Nach dem diskelektrophoretischen Bild nach Reduktion findet die kovalente Bindung an Agarose fast ausschließlich über die ("A") α -Kette statt. Die (B) β -Kette und die γ -Kette stellen sich in gleicher Farbintensität dar, sowohl bei FG-ag wie auch im Vergleich zu löslichem Fibrinogen entsprechender Konzentration. Hieraus läßt sich für die Fibrinogenstruktur annehmen, daß die ("A") α -Ketten an der Moleküloberfläche liegen müssen. Da anzunehmen ist, daß das Fibrinogen nicht immer am identischen Molekülbezirk an Agarose fixiert wird, sondern die Kopplungsstellen wahrscheinlich über das Molekül verteilt sind, läßt sich schließen, daß die ("A") α -Kette die äußere Begrenzung zumindest eines Großteils des Moleküls darstellt. Die (B) β - und γ -Ketten befinden sich geschützt im Inneren des Moleküls, sind damit nicht reaktionsfähig mit Agarose und gewährleisten so die Möglichkeit zur Konformationsänderung des Moleküls beim Übergang von FG-ag zu FM-ag.

Folgende Befunde anderer Autoren stimmen mit den dargestellten Überlegungen überein: eine Quervernetzung der γ -Ketten und eine Inkorporation von Glycinäthylester

(GEE) durch aktiven Faktor XIII erfolgt bei intaktem Fibrinogenmolekül nicht, sondern erst nach Fibrinopeptid "A" - Abspaltung mit einsetzender Polymerisation, die ebenfalls im γ -Kettenbereich ihren Anfang nehmen soll (CHEN, DOOLITTLE 1969; DOOLITTLE et al. 1972; MCDONAGH et al. 1972a). Während Antikörper gegen die isolierte ("A") α - und (B) β -Kette mit intaktem Fibrinogen reagieren, zeigt die Anti- γ -Kette keine Reaktion mit Fibrinogen; antigene Determinanten der ("A") α - und (B) β -Kette sollten an der Moleküloberfläche zugänglich sein, nicht aber Determinanten der γ -Kette (BLOMBÄCK, BLOMBÄCK 1972). Für eine geschützte (B) β -Kette im Fibrinogen und β -Kette im Fibrinmonomer spricht, daß sie nicht an der Quervernetzung durch Faktor XIII teilnehmen, während isolierte β -Ketten einer Quervernetzung zugänglich sind (MCKEE et al. 1970; FINLAYSON et al. 1972). Im Fibrinogen war eine enzymatische Reduktion einiger Disulfidbrücken möglich unter anderem in den α -Ketten im Bereich der hydrophilen Disulfidknoten, während zahlreiche andere Disulfidbrücken nicht angreifbar waren. Es wurde auf eine Oberflächenorientierung der Enzym-sensiblen Molekülbezirke geschlossen (BLOMBÄCK et al. 1974).

Obwohl die ("A") α -Ketten an der Oberfläche zu liegen scheinen, sind sie für die spezifische Faktor XIII - Wirkung erst nach Konformationsänderung im Zuge der Monomerbildung zugänglich.

Die Ergebnisse sind nicht ohne weiteres in Übereinstimmung zu bringen mit dem von MOSESSON et al. (1973b) vorgeschlagenen röhrenförmigen Fibrinogenmodell, dessen sogenanntes Rückgrat die beiden an der Moleküloberfläche liegenden γ -Ketten bilden sollen.

V. Untersuchungen zur Adsorption von Fibrinmonomer aus Plasma an insolubilisiertes Fibrinogen und klinische Anwendung

1. Einleitung

Die bisher beschriebenen Versuche zur Komplexbildung wurden mit reinen Lösungen von Fibrinogen und seinen Derivaten durchgeführt. Um das entwickelte Prinzip für die klinische Diagnose und zur Quantifizierung einer Hyperkoagulabilität, einer Verbrauchskoagulopathie und einer Hyperfibrino(-geno-)lyse anwendbar zu machen, mußte das Adsorptionsverhalten von Fibrinmonomer und Spaltprodukten im plasmatischen System geprüft werden. Mit dem chromatographischen Verfahren wird nach Untersuchungen unter definierten Bedingungen anschließend an drei repräsentativen Beispielen die Leistungsfähigkeit der Methode mit Plasma bzw. Serum demonstriert (HEENE, MATTHIAS 1973; MATTHIAS 1974a; MATTHIAS et al. 1974c).

2. Versuchsbedingungen und Ergebnisse:

Um Aufschluß über das Verhalten von im Plasma gelöstem Fibrinmonomer gegenüber insolubilisiertem Fibrinogen zu erhalten, wurde Fibrinmonomer im Plasma nach den Angaben von GODAL und ABILDGAARD (1966) induziert. Proben von Normalplasma wurden mit minimalen Mengen Thrombin steigender Konzentration über 30 Min. bei 20°C inkubiert. Die Fibrinogenkonzentrationen der Plasmen wurden mit der Tyrosinmethode und der radialen Immundiffusion bestimmt, der Gehalt an Monomer nach Thrombineinwirkung mit dem quantitativen Äthanoltest. Aus Tabelle 6 ist erkennbar, daß der Proteingehalt des nach Äthanolzugabe entstandenen Gels der Thrombinkonzentration korreliert ist; unter der Annahme, daß der Äthanoltest den Gehalt an Monomer im Plasma repräsentiert, werden bis zu 20% des Fibrinogens in Fibrinmonomer umgewandelt.

Plasma- probe	Plasma-Fibrinogen mg / 100 ml		Thrombin pro 1 ml Plasma	mg Gel-Protein pro 100 ml Plasma	% vom
Nr.	Tyrosin- methode	rad. Immun- diffusion	NIH Einheiten	Tyrosin- methode	Plasma- Fibrinogen
1	238	254	0.01	12	5.0
2	261	284	0.05	24	9.2
3	263	289	0.10	37.2	14.2
4	222	254	0.15	46	20.7
5	248	298	0.20	52	21.0

Tab. 6:

Quantitativer Äthanoltest von Plasmen nach Inkubation mit steigenden Thrombinmengen (jeweils Doppelbestimmungen)

5,5 ml des mit Thrombin inkubierten Plasmas wurden auf eine FG-ag - Säule (0,9 x 28 cm) entsprechen lg Fibrinogen aufgetragen und mit Puffer A und B eluiert. Mit Puffer A wurden im Peak I Fibrinogen und alle übrigen Plasmaproteine eluiert, mit Puffer B erfolgte in Peak II die Elution von Fibrinmonomer neben geringen Mengen anderer Proteine. Puffer B war geeignet, da früher geschilderte Versuche ergeben hatten, daß eine Elution von Monomer unterhalb von pH 5,5 und oberhalb einer Salzkonzentration von 0,6 M NaCl erfolgte. Das mit Puffer B eluierte Protein wurde immunologisch als fibrinogenverwandtes Material identifiziert.

Abbildung 19 korrespondiert mit Tabelle 6 und Tabelle 7 und zeigt die Ergebnisse der chromatographischen Experimente. Es besteht eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$)

Plasma- probe Nr.	Zahl der Exp.	mg Protein in Peak II				% vom Plasma- Fibrinogen
		Tyrosin- methode		rad. Immun- diffusion		
		M	SD	M	SD	
1	1	0.59		0.44		3.4
2	3	0.94	0.014	0.65	0.10	4.6
3	3	1.16	0.227	0.82	0.04	5.7
4	2	1.24	0.026	1.08	0.14	8.5
5	2	1.34	0.044	1.22	0.03	8.2

Tab. 7:

Chromatographie von Plasmen nach Inkubation mit steigenden Thrombinmengen an FG-ag (vgl. Tab. 6): Gehalt an Gesamtprotein und von Fibrinogen-verwandtem Material in Peak II nach Elution mit Puffer B; Probe: 5,5 ml Plasma

des quantitativen Äthanoltests sowohl mit der in Peak II mit Puffer B eluierten Gesamtproteinmenge als auch mit der Menge des fibrinogenverwandten Materials. Entsprechend den Ergebnissen der radialen Immundiffusion wurden bis zu 8,5% des aufgetragenen Fibrinogens als fibrinogenverwandtes Material unter den Bedingungen des Puffers A an FG-ag adsorbiert, im Gegensatz zu 21% der Gesamtfibrinogenmenge, die mit Äthanol aus dem gleichen Plasma gelierbar war. Auf die Diskrepanz der Werte wird später eingegangen. Die Proben des mit Puffer B eluierten Peak II wurden vor der Immundiffusion gegen Puffer A dialysiert. Dabei entstand bei den Proben aus den Plasmen mit hoher Thrombinkonzentration vereinzelt ein geringes Präzipitat. Ein Gerinnsel bildete sich auch nach Thrombinzusatz aufgrund der niederen Proteinkonzentration in keinem Falle.

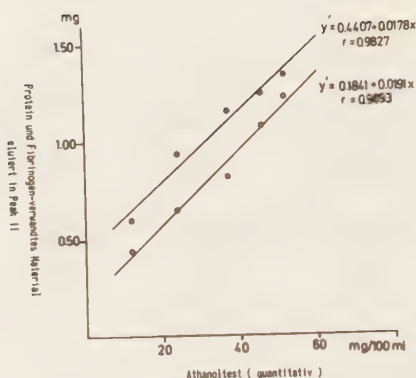


Abb. 19:

Beziehung zwischen den Werten des quantitativen Äthanoltests (Tab. 6) und der Menge des in Peak II eluierten Gesamtproteins (●) bzw. des Fibrinogen-verwandten Materials (○) (Tab. 7)

Bei Auftrag von Normalplasma (Fibrinogenkonzentration 234 mg%, Auftrag 5 ml $\hat{=}$ 17,5 mg) auf eine Säule mit FG-ag (0,9 x 28 cm $\hat{=}$ 1 g FG) und von Normalserum (Auftrag 4,5 ml) auf eine Säule mit FG-ag (Elutionsdiagramm nicht dargestellt) als auch mit FM-ag (jeweils 0,9 x 28 $\hat{=}$ 1 g FG bzw. 1 g FM) wurden mit Puffer B in Peak II zwar geringe Proteinmengen, aber kein fibrinogenverwandtes Material eluiert (Abb. 20 und Abb. 22, jeweils oberes Elutionsdiagramm).

Wurde auf eine Säule mit FG-ag ein gleiches Plasmavolumen einer Patientin aufgetragen, bei der nach Klinik und Gerinnungsanalyse eine disseminierte intravasculäre Gerinnung ablief (septischer Abort, Schock; Fibrinogenkonzentration 123 mg%, Auftrag 5 ml $\hat{=}$ 6,15 mg), so war in dem im Vergleich zum Normalplasma deutlich höheren Peak II als Ausdruck der Monomerämie fibrinogenverwandtes Mate-

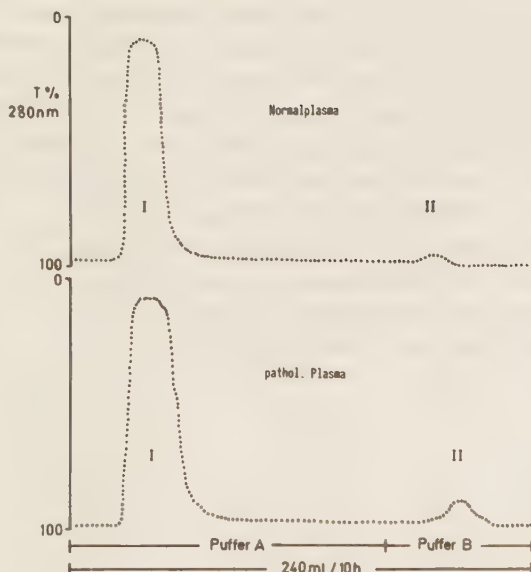


Abb. 20:

Elutionsdiagramm von Normalplasma (oben) und Patientenplasma (unten) nach Chromatographie an FG-ag;
Probe: 5 ml Plasma

rial vorhanden (Abb. 20, unteres Elutionsdiagramm).
Peak II enthielt mit der radialen Immundiffusion gemessen 1,3 mg fibrinogenverwandtes Material pro 5 ml Auftragsvolumen bzw. 26 mg pro 100 ml Plasma; das entsprach etwa 21% des Fibrinogengehalts des Plasmas der Patientin. Mit dem quantitativen Äthanoltest wurden im Gel 41 mg Protein pro 100 ml Plasma gemessen entsprechend ca. 30 % der Fibrinogenmenge pro 100 ml Patientenplasma. Wie schon

in vorausgehenden Experimenten lagen die Werte des Äthanoltests höher als die vergleichbaren Ergebnisse im Adsorptionstest.

Bei einem Patienten ebenfalls mit Verbrauchskoagulopathie und positivem Äthanoltest (chronisch aggressive Hepatitis, FG-Konzentration 62 mg%; Säule: FG-ag, 0,9 x 14 cm $\pm$ 0,5 g FG; Auftrag 2 ml Plasma) (Abb. 21) fanden sich - diesmal mit dem Staphylococcal Clumping Test aus Peak II bestimmt - 3,8 mg fibrinogenverwandtes Material pro 100 ml Plasma, entsprechend 6,2% des Plasmafibrinogengehalts; nach Therapie fiel der Wert auf 1,9 mg/ 100 ml Plasma, entsprechend 1,23% des Fibrinogengehalts von jetzt 158 mg% ab; der Äthanoltest war negativ. Der "Leerwert" für Normalplasmen lag hier bei 0,66% $\pm$ 0,17.

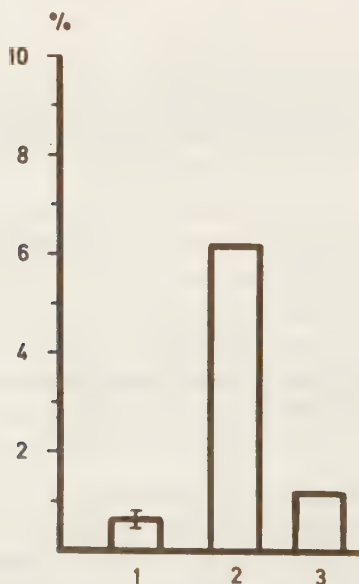


Abb. 21:

Monomer im Plasma in % des Fibrinogens bei einem Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis vor (Säule 2) und nach (Säule 3) Therapie im Vergleich zum Normalwert (Säule 1; n = 6)

Bei Aufgabe von 4,5 ml Serum eines Patienten nach Strep-
tokinasetherapie (thrombotische Stenosed der Femoralarte-
rie) (Abb. 22 unten) auf eine Säule mit FM-ag wurden in
Peak II im Gegensatz zum Normalserum als Ausdruck der
vorhandenen Fibrinogenspaltprodukte 2,15 mg fibrinogen-
verwandtes Material nachgewiesen (Immundiffusion,
Staphylococcal Clumping Test). Vor Auftrag auf die Säule
fanden sich 2,7 mg im gleichen Serumvolumen; das bedeu-
tet eine Wiederfindungsrate von 80%.

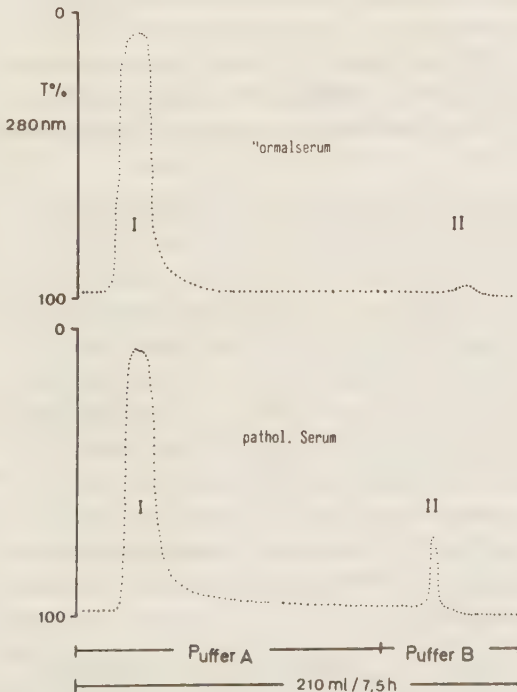


Abb. 22:

Elutionsdiagramm von Normalserum (oben) und Patienten-
serum mit Fibrinogenspaltprodukten (unten) nach Chroma-
tographie an FM-ag; Probe: 4,5 ml Serum

3. Diskussion

Als Beweis für eine Verbrauchskoagulopathie kann der Nachweis zirkulierender Monomere im Plasma angesehen werden. Nachdem die Adsorption von Fibrinogen an FM-ag gelungen war, sollte der umgekehrte Vorgang, die Adsorption von Fibrinmonomer aus Plasma an FG-ag ebenfalls möglich sein. Dies konnte bewiesen werden durch Adsorptionsversuche nach Zugabe von radioaktivem Fibrinmonomer zu Plasmaproben und mit Thrombin-inkubiertem Plasma im Vergleich mit dem Äthanoltest. Durch minimale Thrombinkonzentrationen können geringe Mengen an Monomer im Plasma induziert werden, ohne daß es zur Gerinnungselbildung kommt; der Äthanoltest gilt als spezifischer Nachweis für Monomere (GODAL, ABILDGAARD 1966; BREEN, TULLIS 1968; KIERULF, ABILDGAARD 1971; GODAL, KIERULF 1972).

Mit steigender Thrombinkonzentration im Inkubationsansatz und damit steigender Monomerkonzentration stieg auch die in Peak II eluierte Menge fibrinogenverwandten Materials an; sie ist korreliert zu den Ergebnissen des quantitativen Äthanoltests. Die Werte des Äthanoltests liegen mit einem Anteil von maximal 21% der vorhandenen Fibrinogenmenge höher als die des Peak II, da außer anderen Plasmaproteinen bis zu 30% und mehr Fibrinogen in das sich aus Monomeren bildende Gel eingeschlossen sein können (BLOMBÄCK, BLOMBÄCK 1956; GODAL, KIERULF 1972; KIERULF 1974). Der maximale prozentuale Anteil der Monomere am Fibrinogengehalt des Plasmas lag bei den Chromatographieversuchen bei 8,5%.

Der sogenannte "Leerwert" für Plasmen ohne Thrombinzusatz lag unter 1% der jeweiligen Fibrinogenkonzentration und stimmt mit dem Fibringehalt normalen Citratplasmas, gemessen mit der N-terminalen Glycinbestimmung, überein (KIERULF, ABILDGAARD 1971). Er ist bei jeder der eingesetzten FG-ag - Präparationen etwas unterschiedlich

nd muß jeweils neu bestimmt werden. Er ist abhängig von Monomeren, die normalerweise in vivo vorhanden sind, von der Monomerenbildung während der Phase der Blutentnahme, weiter von der unspezifischen und spezifischen Adsorption durch Spuren von FM-ag in der FG-ag - Säule. Ob alles in Peak II eluierte fibrinogenverwandte Material Monomeren entspricht, muß noch geklärt werden; neben FG-ag ...FM - Komplexen sind FG-ag...FM...FG - Komplexe denkbar, so daß ein Teil des Proteins im Eluat von Peak II Fibrinogen repräsentiert. Das beeinträchtigt jedoch nach den experimentellen Ergebnissen die Aussagefähigkeit der Methode nicht.

Bei Übertragung der geschilderten Versuche auf die Analyse von Patientenplasmen ist es von Bedeutung, neben der Angabe der absoluten Monomermenge in Peak II bzw. pro 100 ml Plasma, den prozentualen Anteil der Monomere auf die gleichzeitig mitbestimmte Fibrinogenkonzentration zu beziehen; denn die Kapazität einer bestimmten Fibrinogenmenge, Fibrinmonomer komplex in Lösung zu halten, ist, wie oben dargestellt, begrenzt. Bei hoher Fibrinogenkonzentration kann die absolute Menge Fibrinmonomer höher sein als bei niedriger Konzentration, obwohl der prozentuale Anteil gleich oder sogar kleiner ist. Trotz geringerer absoluter Monomermenge kann also der relative Umsatz bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen größer sein als bei hohen.

Aufgrund N-terminaler Glycinbestimmungen können unter der Voraussetzung, daß den Molekülen sämtliche vier Fibrinopeptide fehlen, 5 - 6% des vorhandenen Fibrinogens als Monomer gelöst im Plasma vorliegen, bevor es zur Gerinnselbildung kommt. Da Fibrinopeptid "A" schneller als Fibrinopeptid B abgespalten wird und damit Monomere mit erhaltenem Fibrinopeptid B existieren, besteht die Möglichkeit, daß sich das lösliche Monomer bis auf 10% erhöht; der Wert kann bis auf 20% der vorhandenen Fibrinogenkonzentration steigen, wenn man postuliert, daß in

der Anfangsphase der Gerinnung die Fibrinopeptidabspaltung zufällig verteilt ist und "Monomere" mit nur einem fehlenden Fibrinopeptid "A" existieren (GODAL, ABILDGAARD 1966; KIERULF, ABILDGAARD 1971).

Die klinischen Beispiele geben ein eindrucksvolles Bild von der Leistungsfähigkeit der Methode. Die Aussagen mit der FG-ag - Säule sind spezifischer und kommen der wahren Monomerkonzentration näher als die Ergebnisse mit anderen Methoden. Bei der ersten Patientin wurde mit einem Monomeranteil von 21% an der Fibrinogenmenge ein um 30% geringerer Monomerwert gemessen als mit dem quantitativen Äthanoltest. Bei Patient 2 war vor Therapie bei positivem Äthanoltest mit 6,2% Monomeranteil eine deutliche Erhöhung erkennbar; im Verlauf der Therapie wurde der Äthanoltest negativ, die Monomere nahmen absolut wie relativ ab, lagen aber noch über dem Normbereich, d.h. der Prozeß des intravasculären erhöhten Umsatzes war noch nicht abgeschlossen, obwohl der Äthanoltest als Indikator ausfiel und die Gerinnungsfaktoren angestiegen waren; eine Fortsetzung der Heparintherapie war indiziert. Mit der beschriebenen Methodik ist nicht eine Modifikation bestehender Verfahren vorgestellt worden, sondern eine qualitativ neue und in ihrer Aussage, soweit sichtbar, nicht übertroffene Methode zum Nachweis eines erhöhten Umsatzes von Fibrinogen im Plasma gegeben.

Eine exakte Bestimmung von Spaltprodukten aus Blutproben ist zur Zeit mit sämtlichen bekannten Verfahren nicht möglich. Die Methoden weisen gegenüber den einzelnen Spaltprodukten eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf, die Ergebnisse sind also abhängig von der augenblicklichen Phase der Lyse (MELLIGER 1970; MARDER et al. 1971; KRAUSE et al. 1974). Da zur Spaltproduktbestimmung Serum notwendig ist, muß Fibrinogen durch Gerinnung entfernt werden. Dabei werden einmal Spaltprodukte in das Gerinnsel inkorporiert und verschwinden aus dem Serum;

vor allem entgeht FDP-X dem Nachweis, da es selbst gerinnbar ist. Zum anderen wird ein Teil der Monomere durch die Spaltprodukte im Serum gehalten (BANG et al. 1962; BANG 1964; LIPINSKI et al. 1967; MARDER et al. 1969a; NIEWIAROWSKI et al. 1970; WEGRZYNOWICZ et al. 1971; LY, ARNESEN 1972; ARNESEN et al. 1973). Beide Phänomene verfälschen das Ergebnis. Durch Senkung des pH auf 6,3 während der Gerinnung mit der Folge reduzierter Komplexbildung sind exaktere Spaltproduktbestimmungen möglich (ARNESEN et al. 1973).

Erste Versuche weisen daraufhin, daß die Affinität von Fibrinmonomer und der einzelnen Fibrinogenspaltprodukte zu FM-ag unterschiedlich ist, wobei Fibrinmonomer am stärksten haftet. Eine Kontamination der Spaltprodukte durch im Serum komplex vorliegendes Monomer ließe sich durch geeignete Pufferwahl beseitigen, die Spaltprodukte könnten isoliert gemessen werden. Der partielle Einschluß von Spaltprodukten in das Gerinnsel muß weiter in Kauf genommen werden.

Bei dem Patienten mit durch Streptase induzierter Lyse fanden sich in Peak II 80% der vor Chromatographie im Serum bestimmten Menge an Spaltprodukten. Es ist wahrscheinlich, daß im Serum vor Chromatographie neben den Spaltprodukten zusätzlich gelöste Monomere bestimmt wurden, die unter den Elutionsbedingungen an der FM-ag - Säule haften geblieben sind, nicht eluiert und bei der Bestimmung nicht mehr erfaßt wurden.

Komplizierter gestaltet sich das Problem, wenn statt der viel selteneren primären Fibrinogenolyse eine sekundäre Fibrinolyse nach vorhergehender Gerinnung vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen Fibrinogen- und Fibrin-Spaltprodukten ist mit den gängigen Nachweismethoden nicht möglich, sondern nur mit Einsatz differenzierter Techniken wie der Diskelektrophorese, mit der sich als Zeichen einer Degradation vernetzter Fibringerinnsel

d-Dimere bzw. nach Reduktion γ -Dimere nachweisen ließen. Zumindest fdp-x (von Fibrin) verhält sich analog Fibrinmonomer; es ist gerinnbar, fähig zur Komplexbildung mit Fibrinogen und den Spaltprodukten und damit auch zur Adsorption an FG-ag und FM-ag. Dagegen unterscheiden sich die Spaltprodukte der späteren Lysephase von Fibrinogen und Fibrin abgesehen von den d-Dimeren vernetzten Fibrins wohl nicht mehr wesentlich voneinander (MARDER et al. 1969a; MARDER, SHULMAN 1969; NIEWIAROWSKI et al. 1970; GAFFNEY 1973; GAFFNEY, BRASHER 1973a).

Darüberhinaus zeichnet sich die Möglichkeit einer Auftrennung der einzelnen Spaltprodukte durch unterschiedliches Adsorptions- und Elutionsverhalten an FM-ag ab, ohne die bei den bisherigen Separationsmethoden nicht vermeidbare partielle Denaturation. Das wäre ein Fortschritt bei der Untersuchung des biologischen Verhaltens der Spaltprodukte. Die Problematik der Wertung des Verhaltens teilweise denaturierter Fibrinogenspaltprodukte ist auch in dieser Arbeit deutlich geworden.

D. Abschließende Diskussion und Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist die Forschung auf dem Sektor der Struktur und des biologischen Verhaltens von Fibrinogen, Fibrin und deren Degradationsprodukten intensiv vorangetrieben worden. Die Interaktionsmechanismen zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten und deren Auswirkungen im System der Gerinnung sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Fibrinmonomer-Fibrinogen-Komplexen und Fibrinmonomer-Fibrin(-ogen-)spaltproduktkomplexen wurde bei bestimmten Haemostasestörungen unter klinisch-diagnostischen Gesichtspunkten zunehmende Aufmerksamkeit gewidmet.

Ein pathologisch gesteigerter Umsatz von Gerinnungsfaktoren mit Auftreten von Komplexen zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten in der Zirkulation kann in drei Variationen auftreten, die häufig fließend miteinander verbunden sind:

1. als eine ausschließlich gesteigerte Gerinnungstendenz - in ihrer mildesten Form als Hyperkoagulabilität, in ihrer schwersten Form als Verbrauchskoagulopathie (LASCH et al. 1961a; LASCH et al. 1967) mit totalem Zusammenbruch des Haemostasepotentials imponierend;
2. als eine disseminierte intravasculäre Gerinnung mit konsekutiver begleitender Fibrinolyse;
3. als eine dominierende Fibrino(-geno-)lyse.

Vor diesem Hintergrund war es die Intention der Untersuchungen, einen experimentellen Ansatz zu entwickeln, der unter strukturellen, quantitativen und klinisch-diagnostischen Gesichtspunkten die Beziehungen zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten einer differenzierteren Betrachtung als bisher zugänglich macht. Neben der Analyse des Phänomens der Komplexbildung wurde ein Verfahren zum spezifischen und quantitativen Nachweis von Monomer und Spaltprodukten aus dem Plasma bzw. Serum ent-

wickelt, das zur Diagnostik und Verlaufskontrolle unter Therapie oben genannter umsatzbedingter Haemostasestörungen herangezogen werden kann. Die gängigen Verfahren leiden darunter, daß der Nachweis der Fibrinogenderivate lediglich indirekt erfolgt, der Mechanismus des Tests häufig nur unvollständig aufgeklärt ist, durch unspezifische Faktoren mehr oder weniger stark beeinflusst wird oder die Methode einen erheblichen Aufwand erfordert.

Die experimentelle Basis bildet die Insolubilisation von Fibrinogen durch Agarose bei fortbestehenden biologischen Eigenschaften des Fibrinogens wie der Transformation in insolubilisiertes Fibrinmonomer und der Fähigkeit zur Bildung von Komplexen. Mit dem unlöslichen Fibrinogen und Fibrinmonomer verfügt man über ein Präparat, das leicht zu handhaben ist, mit Lösungen nicht mischbar ist und aus Lösungen durch einfache Zentrifugation oder Filtration quantitativ wiedergewonnen werden kann; damit gelingt es, Fibrinogen und dessen Derivate durch selektive reversible Adsorption aus Lösungen zu entfernen und nach Desorption quantitativ nachzuweisen.

Folgender Aufbau liegt der Arbeit zugrunde: In Abschnitt B wird eine Beschreibung des Fibrinogens, der Konversion zu Fibrin und der Lyse gegeben, wie sie zusammen mit den geschilderten gegenseitigen Bezügen unter experimentellen und klinischen Gesichtspunkten notwendig erschien, um die Prinzipien der entwickelten Methoden, die mit ihnen gewonnenen Ergebnisse und die Folgerungen deutlich werden zu lassen. Darüberhinaus sollte ein Bild vom gegenwärtigen Stand der Fibrinogenforschung gegeben werden, wie er sich als Hintergrund dieser Arbeit darstellt. In den Abschnitten C I. und C II. folgen die Darstellung benutzter gängiger Verfahren und die Beschreibung der verschiedenen neu entwickelten Methoden, auf die sich die Realisierung des experimentellen Konzepts gründet. An die einzelnen Abschnitte angeschlossen finden sich jeweils die Untersuchungen zur Qualität,

Leistungsfähigkeit und Aussagekraft sowie eine Diskussion der Verfahren. In Kapitel C III. und C IV. wird das Phänomen der Komplexbildung zwischen Fibrinogen und seinen Derivaten auf experimenteller Basis unter verschiedenen Gesichtspunkten angegangen. Eine ausführliche Diskussion wird auch hier wie im darauf folgenden Kapitel C V., in dem über den klinischen Einsatz berichtet wird, jeweils im Anschluß gegeben.

Abschließend lassen sich folgende essentielle Punkte herausstellen:

1. Fibrinogen kann unter Erhalt seiner biologischen Aktivität insolubilisiert werden (FG-ag); es kann umgewandelt werden in insolubilisiertes Fibrinmonomer (FM-ag).
2. Insolubilisiertes Fibrinogen ist im Sinne der Komplexbildung befähigt zur Adsorption von Fibrinmonomer, insolubilisiertes Fibrinmonomer zur Adsorption von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten.
3. Mit Hilfe des insolubilisierten Fibrinogens bzw. Fibrinmonomers lassen sich quantitativ vergleichende Aussagen über biologische Aktivitäten und zu strukturellen Fragen von Fibrinogen und seinen Derivaten treffen.
4. Insolubilisiertes Fibrinogen und Fibrinmonomer können erfolgreich zur Diagnostik von Zuständen von Hyperkoagulabilität, disseminierter intravasaler Gerinnung und Fibrinogen(-genolyse) eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

ABILDGAARD, U. and H.C. GODAL:

Aggregation of fibrin and fibrinogen by TAME

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 531 (1964)

ALKJAERSIG, N., A.P. FLETCHER and S. SHERRY:

Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states.

II. The significance, mechanism and consequences of defective fibrin polymerization

J. Clin. Invest. 41, 917 (1962)

ALLINGTON, M.J.:

Detection of fibrin(ogen) degradation products by a latex clumping method

Scand. J. Haematol. Suppl. 13, 115 (1971)

ARNESEN, H., B. LY and O.R. ØDEGARD:

Improved quantitation of serum FDP after coagulation at low pH

Thrombosis Research 3, 643 (1973)

ASTRUP, T.:

Fibrinolysis in the organism

Blood 11, 781 (1956)

ASTRUP, T., P. BRAKMAN and U. NISSEN:

The estimation of fibrinogen. A revision.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, 57 (1965)

ASTRUP, T.:

The relation between formation and lysis of fibrin in the body

Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 20, 71 (1966)

AXEN, R. and S. ERNBACK:

Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers

Eur. J. Biochem. 18, 351 (1971)

BANG, N.U.:

Normal and abnormal fibrin polymerization

Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 13, 131 (1964)

BANG, N.U.:

Ultrastructure of the fibrin clot

in: SEEGER, W.H. (Ed):

Blood clotting enzymology

Academic Press, New York, London 1967, p. 487

BANG, N.U.:

Physiology and biochemistry of fibrinolysis

in: BANG, N.U., F.K. BELLER, E. DEUTSCH and E.F. MAMMEN
(Eds):

Thrombosis and bleeding disorders

Thieme, Stuttgart; Academic Press, New York, London

1971, p. 292

BANG, N.U., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S. SHERRY:
Pathogenesis of the coagulation defect developing during
pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states.

III. Demonstration of abnormal clot structure by elec-
tron microscopy

J. Clin. Invest. 41, 935 (1962)

BANG, N.U., Z.S. LATALLLO, M.L. CHANG and L.E. MATTLER:
Molecular composition of soluble fibrin monomer com-
plexes (SMFC)

IVth Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas. Wien 1973,
Abs. No. 349

BELITSER, V.A., T.V. VARETSKAJA and G.V. MALNEVA:

Fibrinogen-fibrin interaction

Biochim. Biophys. Acta 154, 367 (1968)

BELITSER, V.A., V.Ph. MANJAKOV and T.V. VARETSKAJA:

Medium-dependent structure modifications of reconsti-
tuting fibrin

Biochim. Biophys. Acta 236, 546 (1971)

BELITSER, V.A., T.V. VARETSKAJA and V.Ph. MANJAKOV:

On the model for the fibrinogen molecule. Consecutive
stages of fibrin polymerization

Thrombosis Research 2, 567 (1973)

BERG, W. and K. KORSAN-BENGTSSEN:

Separation of human fibrinogen and plasminogen by means
of gel filtration

Thrombos. Diathes. haemorrh. 2, 151 (1963)

BERNFELD, P. and J. WAN:

Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them
into lattices of synthetic polymers

Science 142, 678 (1963)

BLOMBÄCK, B.:

Fibrinogen to fibrin transformation

in: SEEGER, W.H. (Ed.):

Blood clotting enzymology

Academic Press, New York, London 1967, p. 143

BLOMBÄCK, B.:

A story about a fiber

Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 107, 179 (1969a)

BLOMBÄCK, B.:

The N-terminal disulphide knot of human fibrinogen
Brit. J. Haemat. 17, 145 (1969b)

BLOMBÄCK, B.:

Subunit structure of fibrinogen
Scand. J. Haemat. Suppl. 13, 71 (1971)

BLOMBÄCK, B.:

Mode of action of defibrinating enzymes with special
reference to Reptilase and Arvin
IIIrd Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas. Washington
(D.C.) 1972 p.46

BLOMBÄCK, B. and M. BLOMBÄCK:

Purification of human and bovine fibrinogen
Arkiv Kemi 10, 415 (1956)

BLOMBÄCK, B. and T.G. LAURENT:

N-terminal and light-scattering studies on fibrinogen
and its transformation to fibrin
Arkiv Kemi 12, 137 (1958)

BLOMBÄCK, B. and A. VESTERMARK:

Isolation of fibrinopeptides by chromatography
Arkiv Kemi 12, 173 (1958)

BLOMBÄCK, B. and I. YAMASHINA:

On the N-terminal amino acids in fibrinogen and fibrin
Arkiv Kemi 12, 299 (1958)

BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK and P. EDMAN:

On the structure of human fibrinopeptides
Acta Chem. Scand. 17, 1184 (1963)

BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, N.J. GRÖNDAHL, C. GUTHRIE
and M. HINTON:

Studies on fibrinopeptides from primates
Acta Chem. Scand. 19, 1788 (1965)

BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, P. EDMAN and B. HESSEL:

Human fibrinopeptides. Isolation, characterization and
structure
Biochim. Biophys. Acta 115, 371 (1966)

BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, A. HENSCHEN, B. HESSEL,
S. IWANAGA and K.R. WOODS:

N-terminal disulphide knot of human fibrinogen
Nature 218, 130 (1968a)

BLOMBÄCK, M., B. BLOMBÄCK, E.F. MAMMEN and A.S. PRASAD:
Fibrinogen Detroit - a molecular defect in the N-terminal
disulphide knot of human fibrinogen?
Nature 218, 134 (1968b)

BLOMBÄCK, B., B. HESSEL, S. IWANAGA, J. REUTERBY and
M. BLOMBÄCK:
Primary structure of human fibrinogen and fibrin.
I. Cleavage of fibrinogen with cyanogen bromide. Isola-
tion and characterization of NH₂-terminal fragments of
the α ("A") chain
J. Biol. Chem. 247, 1496 (1972)

BLOMBÄCK, B. and M. BLOMBÄCK:
The molecular structure of fibrinogen
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 77 (1972)

BLOMBÄCK, B., N.J. GRÖNDAHL, B. HESSEL, S. IWANAGA and
P. WALLEN:
Primary structure of human fibrinogen and fibrin.
II. Structural studies on NH₂-terminal part of γ -chain
J. Biol. Chem. 248, 5806 (1973)

BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, W. FINKBEINER, A. HOLMGREN,
B. KOWALSKA-LOTH and G. OLOVSON:
Enzymatic reduction of disulfide bonds in fibrin-ogen
by the thioredoxin system. I. Identification of reduced
bonds and studies on reoxidation process
Thrombosis Research 4, 55 (1974)

BRAKMAN, P. and T. ASTRUP:
The fibrin plate method for assay of fibrinolytic agents
in: BANG, N.U., F.K. BELLER, E. DEUTSCH, E.F. MAMMEN
(Eds.): Thrombosis and bleeding disorders
Thieme, Stuttgart; Academic Press, New York, London
1971, p. 332

BRAY, G.A.:
A simple efficient liquid scintillator for counting
aqueous solutions in a liquid scintillation counter
Anal. Biochem. 1, 279 (1960)

BREEN, F.A. and J.L. TULLIS:
Ethanol gelation: A rapid screening test for intra-
vascular coagulation
Ann. Intern. Med. 69, 1197 (1968)

BROCKWAY, W.J. and F.J. CASTELLINO:
Measurement of the binding of antifibrinolytic amino
acids to various plasminogens
Arch. Biochem. Biophys. 151, 194 (1972)

BUDZYNSKI, A.Z., Z.S. LATALLO, B. LIPINSKI and E. KOWALSKI:

The effect of pH on the interaction of fibrinogen degradation products (FDP) with the fibrinogen-fibrin conversion

Bull. Acad. Pol. Sci. (Ser. Sci. biol.) 11, 477 (1963)

BUDZYNSKI, A.Z., M. STAHL, M. KOPEC, Z.S. LATALLO, Z. WEGRZYNOWICZ and E. KOWALSKI:

High molecular weight products of the late stage of fibrinogen proteolysis by plasmin and their structural relation to the fibrinogen molecule

Biochim. Biophys. Acta 147, 313 (1967)

BUDZYNSKI, A.Z. and M. STAHL:

Partial reduction of bovine fibrinogen by some sulphydryl compounds

Biochim. Biophys. Acta 175, 282 (1969)

CASPARY, E.A. and R.A. KEKWICK:

Some physicochemical properties of human fibrinogen

Biochem. J. 67, 41 (1957)

CATT, K.J., J. HIRSH, D.J. CASTELAN, H.D. NIALL and G.W. TREGEAR:

Radioimmunoassay of fibrinogen and its proteolysis products

Thrombos. Diathes. haemorrh. 20, 1 (1968)

CHEN, R. and R.F. DOOLITTLE:

Identification of the polypeptide chains involved in the cross-linking of fibrin

Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 420 (1969)

CHEN, R. and R.F. DOLLITTLE:

γ - γ cross-linking sites in human and bovine fibrin

Biochemistry 10, 4486 (1971)

COHEN, C., H. SLAYTERS, L. GOLDSTEIN, J. KUCERA and C. HALL:

Polymorphism in fibrinogen aggregates

J. Mol. Biol. 22, 385 (1966)

COHN, E.J., L.E. STRONG, W.L. HUGHES, D.J. MULFORD, J.N. ASHWORTH, M. MELIN and H.L. TAYLOR:

Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids

J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946)

CROWELL, J.W. and W.L. READ:

In vivo coagulation - a probable cause of irreversible shock

Amer. J. Physiol. 183, 565 (1955)

CUATRECASAS, P., M. WILCHEK and C.B. ANFINSEN:
Selective enzyme purification by affinity chromatography
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 61, 636 (1968)

DANDLIKER, W.B. and V.A. de SAUSSURE:
Stabilization of macromolecules by hydrophobic bonding:
role of water structure and of chaotropic ions
in HAIR, M.L. (Ed.):
The chemistry of biosurfaces
Marcel Dekker Inc. New York 1971, Vol I, p. 1

DERECHIN, M. and S. SZUCHET:
Fibrinolytic paracoagulation with different substances
Acta physiol. Latinam. 6, 170 (1956)

DONNELLY, T.H., M. LASKOWSKI, N. NOTLEY and H.A. SCHERAGA:
Equilibria in the fibrinogen-fibrin conversion.
II. Reversibility of the polymerization steps
Arch. Biochem. 56, 369 (1955)

DOOLITTLE, R.F., R. CHEN and F. LAU:
Hybrid fibrin: proof of the intermolecular nature of
 γ - γ crosslinking units
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 94 (1971)

DOOLITTLE, R.F., K.G. CASSMAN, R. CHEN, J.J. SHARP and
G.L. WOODING:
Correlation of the mode of fibrin polymerization with
the pattern of cross-linking
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 114 (1972)

DUDEK, G.A., M. KLOCZEWIAK, A.Z. BUDZYNSKI, Z.S. LATALLO
and M. KOPEC:
Characterisation and comparison of macromolecular end
products of fibrinogen and fibrin proteolysis by plasmin
Biochim. Biophys. Acta 214, 44 (1970)

DUDEK-WOJCIECHOWSKA, G.A., M. KLOCZEWIAK, Z.S. LATALLO
and M. KOPEC:
Characterisation of large fragments rich in disulphide
bridges from CNBr-treated products of exhaustive pro-
teolysis of fibrinogen by plasmin
Biochim. Biophys. Acta 295, 536 (1973a)

DUDEK-WOJCIECHOWSKA, G., M. KLOCZEWIAK, E. TEISSEYRE
and Z.S. LATALLO:
Studies on double D fragment from cross linked bovine
fibrin
IVth Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas. Wien 1973b,
Abs. No. 236

DUNKER, A.K. and R.R. RUECKERT:
Observations on molecular weight determinations on poly-
acrylamide gel
J. Biol. Chem. 244, 5074 (1969)

EKERT, H. and R.H. MUNTZ:

Plasmin lysis of fibrinogen and fibrin and the antigenic properties of their degradation products
Brit. J. Haemat. 22, 103 (1972)

FERREIRA, H.C. and L.G. MURAT:

An immunological method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states
Brit. J. Haemat. 9, 299 (1963)

FERRY, J.D.:

The mechanism of polymerization of fibrinogen
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 566 (1952)

FINLAYSON, J.S.:

Chromatographic purification of fibrinogen
in: LAKI, K. (Ed.): Fibrinogen
Marcel Dekker Inc., New York 1968, p. 39

FINLAYSON, J.S. and M.W. MOSESSON:

Heterogeneity of human fibrinogen
Biochemistry 2, 42 (1963)

FINLAYSON, J.S., M.W. MOSESSON, T.J. BRONZERT and J.J. PISANO:

Human fibrinogen heterogeneities. II. Cross-linking capacity of high solubility catabolic intermediates
J. Biol. Chem. 247, 5220 (1972)

FINLAYSON, J.S. and M.W. MOSESSON:

Crosslinking of α chain remnants in human fibrin
Thrombosis Research 2, 467 (1973)

FISCHER, A., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S. SHERRY:
Immuno-electrophoretic characterization of plasma fibrinogen derivatives in patients with pathological plasma proteolysis

J. Lab. Clin. Med. 70, 903 (1967)

FLETCHER, A.P. and N. ALKJAERSIG:

Plasma fibrinogen and hemostatic functions (pathological and genetic disorders)
in: BROWN, E.B. and C.V. MOORE (Eds.):

Progress in Hematology

Grune and Stratton, New York, London 1966, Vol.V p. 246

FLETCHER, A.P., N. ALKJAERSIG, S. FISHER and S. SHERRY:
The proteolysis of fibrinogen by plasmin: The identification of thrombin-clottable fibrinogen derivatives which polymerize abnormally

J. Lab. Clin. Med. 68, 780 (1966)

FLETCHER, A.P. and N. ALKJAERSIG:

Blood hypercoagulability and thrombosis
Clin. Res. 18, 531 (1970)

FLETCHER, A.P., N. ALKJAERSIG, J. O'BRIEN and V.G. TULEVSKI:
Blood hypercoagulability and thrombosis
Trans. Ass. Amer. Phys. 83, 159 (1970)

FURLAN, M. and E.A. BECK:
Plasmic degradation of human fibrinogen. I. Structural
characterization of degradation products
Biochim. Biophys. Acta 263, 631 (1972)

GABEL, D. and B.v. HOFSTEN:
Some properties of a bacterial proteinase chemically
fixed to agarose
Eur. J. Biochem. 15, 410 (1970)

GAFFNEY, P.J.:
Localisation of carbohydrate in the subunits of human
fibrinogen and its plasmin induced fragments
Biochim. Biophys. Acta 263, 453 (1972a)

GAFFNEY, P.J.:
The problem of a reference material for fibrinogen/
fibrin fragment D produced in vivo
IIIrd Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas, Washington
(D.C.) 1972b, p. 288

GAFFNEY, P.J.:
Subunit relationships between fibrinogen and fibrin de-
gradation products
Thrombosis Research 2, 201 (1973)

GAFFNEY, P. and P. DOBOS:
A structural aspect of human fibrinogen suggested by
its plasmin degradation
FEBS Lett. 15, 13 (1971)

GAFFNEY, P.J. and M. BRASHER:
Methods of examining fibrinolysis in plasma
Nature 244, 361 (1973a)

GAFFNEY, P.J. and M. BRASHER:
Subunit structure of the plasmin-induced degradation
products of crosslinked fibrin
Biochim. Biophys. Acta 295, 308 (1973b)

GARDLUND, B., B. KOWALSKA-LOTH, N. GRÖNDAHL and
B. BLOMBÄCK:
Hydrophobic disulphide knot in human fibrinogen
IIIrd Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas. Washington
(D.C.) 1972a, p. 92

GARDLUND, B., B. KOWALSKA-LOTH, N.J. GRÖNDAHL and
B. BLOMBÄCK:
Plasmic degradation products of human fibrinogen.
I. Isolation and characterization of fragments E and D
and their relation to "disulfide knots"
Thrombosis Research 1, 371 (1972b)

GLADNER, J.A.:

The action of thrombin on fibrinogen
in: LAKE, K. (Ed.): Fibrinogen
Marcel Dekker Inc. New York 1968, p. 87

GODAL, H.C. and U. ABILDGAARD:

Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol
Scand. J. Haemat. 3, 342 (1966)

GODAL, H.C. and P. KIERULF:

Evaluation of the ethanol test by N-terminal amino acid
analysis.

IIIrd Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas. Washington
(D.C.) 1972, p. 324

GOLLWITZER, R., H.E. KARGES, H. HÖRMAN and K. KÜHN:

Electron microscopic investigations on soluble and in-
soluble bovine fibrin
Biochim. Biophys. Acta 207, 445 (1970)

GORMAN, J.J. and P.A. CASTALDI:

Human fibrinopeptides as antithrombins
Thrombos. Diathes. haemorrh. 29, 347 (1973)

GORMSEN, J. and C. FEDDERSEN:

Degradation of stabilized and non-stabilized fibrin
clots by plasmin: An immunological study
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 329 (1972)

GORMSEN, J., C. FEDDERSEN, I. CLEMMENSEN and R.B.
ANDERSEN:

Degradation of fibrinogen in vitro. Demonstration of
several antigenic intermediates by specific anti-D and
anti-E serum
Scand. J. Haemat. 9, 577 (1972)

GRAEFF, H., R.v. HUGO, W. KUHN, H. SCHOLZ, A. ERNST
and R. GASTROPH:

Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight
than that of the parent molecule in cord vein plasma
of newborns.

I. Identification in single plasma samples
Klin. Wschr. 51, 695 (1973)

GUREWICH, V., B. LIPINSKI and I. LIPINSKA:

A comparative study of precipitation and paracoagula-
tion by protamine sulfate and ethanol gelation tests
Thrombosis Research 2, 539 (1973)

HALL, C.E. and H.S. SLAYTER:

The fibrinogen molecule: Its size, shape, and mode of
polymerisation
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 11 (1959)

HARDAWAY, R.M.:

Shock and disseminated intravascular coagulation
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 20, 121 (1966)

HARDER, A.J. and P.W. STRAUB:

In vitro and in vivo induction of cryofibrinogen and
"paracoagulation" by Reptilase
Thrombos. Diathes. haemorrh. 26, 337 (1972)

HAWIGER, J., S. NIEWIAROWSKI, V. GUREWICH and D.P.
THOMAS:

Measurement of fibrinogen and fibrin degradation pro-
ducts in serum by staphylococcal clumping test
J. Lab. Clin. Med. 75, 93 (1970)

HEENE, D.L.:

Gerinnungsanalytische Untersuchungen zum Verhalten des
fibrinstabilisierenden Faktors bei Aktivierung des Ge-
rinnungs- und Fibrinolysesystems. Ein Beitrag zur Diag-
nostik und Genese des erworbenen Mangels an fibrinsta-
bilisierendem Faktor
Habilitationsschrift, Gießen 1969

HEENE, D.L.:

Clinical and laboratory diagnosis of the hemostatic
defect in shock
in: LASCH, H.G. (Ed.):
Microcirculation, hemostasis and shock
F.K. Schattauer, Stuttgart - New York 1970, p. 103

HEENE, D.L.:

Methodik zur Feststellung der disseminierten intravasku-
lären Gerinnung
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 50, 33 (1971)

HEENE, D.L. und H.G. LASCH:

Leistungsfähigkeit und Grenzen der Labordiagnostik dif-
fuser intravasculärer Gerinnungsprozesse
Internist 14, 154 (1973)

HEENE, D.L. and F.R. MATTHIAS:

Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized
fibrinogen and fibrinmonomer
Thrombosis Research 2, 137 (1973)

HENSCHEN, A.:

S-sulfo-derivatives of fibrinogen and fibrin: prepara-
tions and general properties
Arkiv Kemi 22, 1 (1964)

HERZIG, R.H., O.D. RATNOFF and J.R. SHAINOFF:

Studies on a procoagulant fraction of southern copper-
head snake venom: The preferential release of fibrino-
peptide B
J. Lab. Clin. Med. 76, 451 (1970)

HESSEL, B. and M. BLOMBÄCK:

The proteolytic action of the snake venom enzymes Arvin and Reptilase on N-terminal chain-fragments of human fibrinogen

FEBS Lett. 18, 318 (1971)

HUGO, v., R. and H. GRAEFF:

Formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma

Thrombosis Research 3, 183 (1973a)

HUGO, v., R. and H. GRAEFF:

Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns.

II. Further characterization from pooled plasma

Klin. Wschr. 51, 699 (1973b)

HUGO, v., R. and H. GRAEFF:

Fibrin-I degradation products with a molecular weight higher than that of fibrinogen. Identification and characterization of in vitro products from human plasma

Thrombos. Diathes. haemorrh. 29, 122 (1973c)

HULME, B. and P.M. PITCHER:

Rapid Latex-screening test for detection of fibrin/fibrinogen degradation-products in urine after renal transplantation

Lancet I (1973), 6

HUSEBY, R.M. and N.U. BANG:

Fibrinogen

in: BANG, N.U., F.K. BELLER, E. DEUTSCH and E.F. MAMMEN (Eds.): Thrombosis and bleeding disorders

Thieme, Stuttgart; Academic Press, New York, London 1971, p. 222

IWANAGA, S., B. BLOMBÄCK, N.J. GRÖNDAHL, B. HESSEL and P. WALLEN:

Amino acid sequence of the N-terminal part of γ -chain in human fibrinogen

Biochim. Biophys. Acta 160, 280 (1968)

IWANAGA, S., P. WALLEN, N.J. GRÖNDAHL, A. HENSCHEN and B. BLOMBÄCK:

On the primary structure of human fibrinogen. Isolation and characterization of N-terminal fragments from plas-mic digests

Eur. J. Biochem. 8, 189 (1969)

IWANAGA, S. and M. OKUDE:

Carboxyl-terminal structures of mammalian fibrinogen and fibrin

Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 308 (1972)

JAMIESON, G.A. and P.J. GAFFNEY:
Nature of the high molecular weight fraction of fibrinolytic digests of human fibrinogen
Biochim. Biophys. Acta 154, 96 (1968)

JERUSHALMY, Z. and M.B. ZUCKER:
Some effects of fibrinogen degradation products (FDP) on blood platelets
Thrombos. Diathes. haemorrh. 15, 413 (1966)

JOHNSON, P. and E. MIHALYI:
Physicochemical studies of bovine fibrinogen. I. Molecular weight and hydrodynamic properties of fibrinogen and fibrinogen cleaved by sulfite in 5 M guanidine-HCl solution
Biochim. Biophys. Acta 102, 467 (1965a)

JOHNSON, P. and E. MIHALYI:
Physicochemical studies of bovine fibrinogen. II. Depolarization of fluorescence studies
Biochim. Biophys. Acta 102, 476 (1965b)

KARGES, H.E. and K. KÜHN:
The cross striation pattern of the fibrin fibril
Eur. J. Biochem. 14, 94 (1970)

KAY, D. and B.J. CUDDIGAN:
The fine structure of fibrin
Brit. J. Haemat. 13, 341 (1967)

KAZAL, L.A., S. AMSEL, O.P. MILLER and L.M. TOCANTINS:
The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 113, 989 (1963)

KEKWICK, R.A., M.E. MACKAY, M.H. NANCE and B.R. RECORD:
The purification of human fibrinogen
Biochem. J. 60, 671 (1955)

KIERULF, P. and U. ABILDGAARD:
Studies on soluble fibrin in plasma. I. N-terminal analysis of a modified fraction I (Cohn) from normal and thrombin-incubated plasma
Scand. J. clin. Lab. Invest. 28, 231 (1971)

KJELDAHL, J.:
Titrimetrische Stickstoffbestimmung
Z. anal. Chem. 22, 366 (1883)

KLINE, D.L.:
Caseinolytic technique
in: BANG, N.U., F.K. BELLER, E. DEUTSCH, E.F. MAMMEN (Eds.): Thrombosis and bleeding disorders
Thieme, Stuttgart; Academic Press, New York, London
1971, p. 358

KLOCZEWIAK, M., G. DUDEK-WOJCIECHOWSKA, A. PANKIEWICZ,
Z. LATALLO and M. KOPEC:
Fragments resulting from CNBr cleavage of bovine fi-
brinogen and its D and E derivatives
Thrombosis Research 2, 271-282 (1973)

KLOCZEWIAK, M., Z. WEGRZYNOWICZ, F.R. MATTHIAS, D.L.
HEENE, M. ZAJDEL:
Über ein chemisch modifiziertes Fibrinogen - Modell ei-
ner Dysfibrinogenämie
18. Tagung Dtsch. Arbeitsgemeinschaft. Blutgerinnungsforsch.
Bern 1974
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. im Druck

KÖPPEL, G.:
Electron microscopic investigation of the shape of fi-
brinogen nodules: a model for certain proteins
Nature 212, 1608 (1966)

KÖPPEL, G.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Gestalt und
zum makromolekularen Aufbau des Fibrinogenmoleküls und
der Fibrinfasern
Z. Zellforsch. 77, 443 (1967)

KÖPPEL, G.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Anordnung
der Polypeptidketten im Fibrinogenmolekül
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 25, 129 (1968)

KÖPPEL, G.:
Morphology of the fibrinogen molecule
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 39, 71 (1970)

KOPEC, M., E. KOWALSKI and J. STACHURSKA:
Studies on paracoagulation. Role of antithrombin VI
Thrombos. Diathes. haemorrh. 5, 285 (1961)

KOPEC, M., A. BUDZYNSKI, J. STACHURSKA, Z. WEGRZYNOWICZ
and E. KOWALSKI:
Studies on the mechanism of interference by fibrinogen
degradation products (FDP) with the platelet function.
Role of fibrinogen in the platelet atmosphere
Thrombos. Diathes. haemorrh. 15, 176 (1966)

KOPEC, M., Z. WEGRZYNOWICZ, M. ZAJDEL and Z.S. LATALLO:
Reptilase, Arvin, thrombin and staphylothrombin:
susceptibility to plasmin and FDP formation
IIIrd Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas., Washington
(D.C.) 1972, p. 300

KOPEC, M., E. TEISSEYRE, G. DUDEK-WOJCIECHOWSKA, M.
KLOCZEWIAK, A. PANKIEWICZ and Z.S. LATALLO:
Studies on the "double d" fragment from stabilized
bovine fibrin
Thrombosis Research 2, 283 (1973)

KOWALSKA-LOTH, B., B. GÄRTLUND, N. EGGERG and B. BLOMBÄCK:

Plasmic degradation products of human fibrinogen.

II. Chemical and immunological relation between fragment E and N-DSK

Thrombosis Research 2, 423 (1973)

KOWALSKI, E.:

Fibrinogen derivatives and their biologic activities

Sem. Hemat. 5, 45 (1968)

KOWALSKI, E.:

Fibrinogenspaltprodukte und ihre Komplexe mit Fibrinmonomeren

Fol. haemat. 92, 20 (1969)

KOWALSKI, E., M. KOPEC and Z. WĘGRZYŃOWICZ:

Influence of fibrinogen degradation products (FDP) on platelet aggregation, adhesiveness and viscous metamorphosis

Thrombos. Diathes. haemorrh. 10, 406 (1964)

KRAUSE, W.H., F.R. MATTHIAS und W. MAUS:

Vergleich von Staphylococcal Clumping-Test und Latex Agglutinations-Test zur Bestimmung isolierter Fibrinogenspaltprodukte

Klin. Wschr. 52, 455 (1974)

KRISTIANSEN, T., L. SUNDBERG and J. PORATH:

Studies on blood group substances II. Coupling of blood group substance A to hydroxyl-containing matrices, including aminoethyl cellulose and agarose

Biochim. Biophys. Acta 184, 93 (1969)

KUDRYK, B., J. REUTERBY and B. BLOMBÄCK:

Adsorption of plasmic fragment D to thrombin modified fibrinogen-sepharose

Thrombosis Research 2, 297 (1973)

KUDRYK, B.J., D. COLLEN, K.R. WOODS and B. BLOMBÄCK:

Evidence for localization of polymerisation sites in fibrinogen

Biochemistry 1974, in press

KWAAN, H.C., G.H. BARLOW and M. SUWANWELA:

Fibrinogen and its derivatives in relationship to Ancrod and Reptilase

Thrombosis Research 2, 123 (1973)

LAHIRI, B. and J.R. SHAINOFF:

Fate of fibrinopeptides in the reaction between human plasmin and fibrinogen

Biochim. Biophys. Acta 303, 161 (1973)

LAKI, K.:

The action of thrombin on fibrinogen
Science 144, 435 (1951a)

LAKI, K.:

The polymerization of proteins: The action of thrombin
on fibrinogen
Arch. Biochem. 32, 317 (1951b)

LAKI, K. and L. LORAND:

On the solubility of fibrin clots
Science 108, 280 (1948)

LAKI, K., J.A. GLADNER and J.E. FOLK:

Some aspects of the fibrinogen-fibrin transition
Nature 187, 758 (1960)

LAKI, K. and J.A. GLADNER:

Chemistry and physiology of the fibrinogen-fibrin
transition
Physiol. Rev. 44, 127 (1964)

LANG, K.:

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl
in: HINSBERG, K. und K. LANG (Ed.):
Medizinische Chemie
Urban und Schwarzenberg, München, Wien 1957, S. 960

LARRIEU, M.J., V.J. MARDER and S. INCEMAN:

Effects of fibrinogen degradation products on plate-
lets and coagulation
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 20, 215 (1966)

LARRIEU, M.J., C. RIGOLLOT and V.J. MARDER:

Comparative effects of fibrinogen degradation frag-
ments D and E on coagulation
Brit. J. Haemat. 22, 719 (1972)

LASCH, H.G.:

Therapeutic aspects of disseminated intravascular
coagulation
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 36, 281 (1969)

LASCH, H.G.:

Gibt es "latente Gerinnung"?
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 50, 87 (1971)

LASCH, H.G. und L. ROKA:

Zur Prothrombinbildung in der Leber
Z. physiol. Chem. 294, 30 (1953)

LASCH, H.G., H.J. KRECKE, F. RODRIGUEZ-ERDMANN,
H.H. SESSNER und G. SCHÜTTERLE:

Verbrauchskoagulopathien (Pathogenese und Therapie)
Fol. haemat. N.F. 6, 326 (1961a)

LASCH, H.G., K. MECHELKE, E. NUSSEK und F. DAOUD:
Der Einfluß der Fibrinolyse auf den Verlauf des
hämorrhagischen Schocks
Klin. Wschr. 39, 1137 (1961b)

LASCH, H.G., L. ROKA and D.L. HEENE:
The defibrination syndrome
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 20, 97 (1966)

LASCH, H.G., D.L. HEENE, K. HUTH and W. SANDRITTER:
Pathophysiology, clinical manifestation and therapy
of consumption-coagulopathy (Verbrauchskoagulopathie)
Amer. J. Cardiol. 20, 381 (1967)

LASCH, H.G., K. HUTH, D.L. HEENE, G. MÜLLER-BERGHHAUS,
M.-H. HÖRDER, H. JANZARIK, C. MITTERMAYER und W. SAND-
RITTER:
Die Klinik der Verbrauchskoagulopathie
Dtsch. med. Wschr. 96, 715 (1971)

LATALLO, Z.S., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S.
SHERRY:
Influence of pH, ionic strength, neutral ions, and
thrombin on fibrin polymerization
Am. J. Physiol. 202, 675 (1962a)

LATALLO, Z.S., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S.
SHERRY:
Inhibition of fibrin polymerization by fibrinogen pro-
teolysis products
Am. J. Physiol. 202 681 (1962b)

LATALLO, Z.S., A.Z. BUDZYNSKI, B. LIPINSKI and E. KO-
WALSKI:
Inhibition of thrombin and of fibrin polymerization,
two activities derived from plasmin-digested fibrinogen
Nature 203, 1184 (1964)

LATALLO, Z.S., E. TEISSEYRE, Z. WEGRZYNOWICZ and M.
KOPEC:
Degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes
Scand. J. Haemat. Suppl. 13, 15 (1971)

LAURENT, T.C. and B. BLOMBÄCK:
On the significance of the release of two different
peptides from fibrinogen during clotting
Acta Chem. Scand. 12, 1875 (1958)

LEDERER, K.:
Small angle X-ray scattering measurements with dilute
solutions of bovine fibrinogen
J. Mol. Biol. 63, 315 (1972)

LIPINSKI, B., A.Z. BUDZYNSKI, Z.S. LATALLO and E. KO-WALSKI:

Isolation and characterization of cold-insoluble fibrinogen complex from bovine plasma
Acta biochim. pol. 11, 527 (1964)

LIPINSKI, B., Z. WEGRZYNOWICZ, A.Z. BUDZYNSKI, M. KOPEC, Z.S. LATALLO and E. KOWALSKI:

Soluble unclottable complexes formed in the presence of fibrinogen degradation products (FDP) during the fibrinogen-fibrin conversion and their potential significance in pathology
Thrombos. Diathes. haemorrh. 17, 65 (1967)

LIPINSKI, B. and K. WOROWSKI:

Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test
Thrombos. Diathes. haemorrh. 20, 44 (1968)

LIPINSKI, B. and V. GUREWICH:

Non-clottable, protamine sulfate precipitable protein of blood. Studies on its in vitro generation and incorporation into the fibrin clot
Thrombosis Research 1, 569 (1972)

LOEWY, A.G.:

Some thoughts on the state in nature, biosynthetic origin, and function of factor XIII
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 41 (1972)

LOEWY, A.G., K. DUNATHAN, R. KRIEL and H.L. WOLFINGER:

Fibrinase I. Purification of substrate and enzyme
J. Biol. Chem. 236, 2625 (1961a)

LOEWY, A.G., A. DAHLBERG, K. DUNATHAN, R. KRIEL and H.L. WOLFINGER:

Fibrinase II. Some physical properties
J. Biol. Chem. 236, 2634 (1961b)

LORAND, L.:

Physiological roles of fibrinogen and fibrin
Fed. Proc. 24, 784 (1965)

LORAND, L. and A. JACOBSEN:

Specific inhibitors and the chemistry of fibrin polymerization
Biochemistry 3, 1939 (1964)

LORAND, L. and A. JACOBSEN:

Labeling of the polymerization centers of fibrin in presence of thrombin activated fibrin stabilizing factor (FSF)
Fed. Proc. 24, 260 (1965)

LORAND, L. and H.H. ONG:

Labeling of amine-acceptor cross-linking sites of fibrin by transeptidation
Biochemistry 5, 1747 (1966)

LORAND, L., N.G. RULE, H.H. ONG, R. FURLANETTO, A. JACOBSEN, J. DOWNEY, N. ÖNER and J. BRUNER-LORAND:

Amine specificity in transeptidation. Inhibition of fibrin cross-linking
Biochemistry 7, 1214 (1968)

LORAND, L., D. CHENOWETH and A. GRAY:

Titration of the acceptor cross-linking sites in fibrin
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 155 (1972)

LY, B. and H. ARNESEN:

Effect of pH on the clotting of fibrinogen in the presence of fibrinogen degradation products as studied by tracer technique
IVth Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas., Wien 1973, Abs. No. 331

MANCINI, G., A.O. CARBONARA and J.F. HEREMANS:

Immunochemical quantitation of antigens by single-radial immunodiffusion
Immunochem. 2, 235 (1965)

MARDER, V.J.:

Immunologic structure of fibrinogen and its plasmin degradation products: Theoretical and clinical considerations
in: LAKI, K. (Ed.): Fibrinogen
Marcel Dekker Inc., New York 1968, p. 339

MARDER, V.J.:

Identification and purification of fibrinogen degradation products produced by plasmin. Considerations on the structure of fibrinogen
Scand. J. Haemat. Suppl. 13, 21 (1971)

MARDER, V.J., N.R. SHULMAN and W.R. CARROLL:

The importance of intermediate degradation products of fibrinogen in fibrinolytic hemorrhage
Trans. Ass. Amer. Phys. 80, 156 (1967)

MARDER, V.J., N.R. SHULMAN and W.R. CARROLL:

High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin I. Physicochemical and immunological characterization
J. Biol. Chem. 244, 2111 (1969a)

MARDER, V.J. and N.R. SHULMAN:

High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin II. Mechanisms of their anticoagulant activity
J. Biol. Chem. 244, 2120 (1969)

MARDER, V.J., H.L. JAMES and S. SHERRY:
The purification of fibrinogen degradation products
by Pevikon block electrophoresis
Thrombos. Diathes. haemorrh. 22, 234 (1969b)

MARDER, V.J., M.O. MATCHETT and S. SHERRY:
Detection of serum fibrinogen and fibrin degradation
products. Comparison of six technics using purified
products and application in clinical studies
Amer. J. Med. 51, 71 (1971)

MARDER, V.J., A.Z. BUDZYNSKI and H.L. JAMES:
High molecular weight derivatives of human fibrinogen
produced by plasmin. III. Their NH₂-terminal amino acids
and comparison with the 'NH₂-terminal disulfide knot'
J. Biol. Chem. 247, 4775 (1972)

MATTHIAS, F.R.:
Nachweis von Fibrinmonomeren und Fibrinogen-Spaltpro-
dukten im Plasma bzw. Serum durch Adsorption an insolu-
bilisiertes Fibrinogen und Fibrinmonomer
Intensivmedizin 1974a, im Druck

MATTHIAS, F.R.:
Complex formation between fibrinogen, fibrinogen de-
gradation products and insolubilized fibrin monomer at
different pH-values
Haemostasis 1974b, im Druck

MATTHIAS, F.R., D.L. HEENE and E. KONRADI:
Behaviour of fibrinogen and fibrinogen degradation
products (FDP) towards insolubilized fibrinmonomer
Thrombosis Research 3, 657 (1973)

MATTHIAS, F.R. and D.L. HEENE:
Comparative adsorption studies between fibrinogen and
its degradation products and fibrinmonomer produced by
reptilase and thrombin
Thrombosis Research 3, 745 (1973)

MATTHIAS, F.R., W. KRAUSE and D.L. HEENE:
Fibrinogenolysis by insolubilized plasmin
Clin. Chim. Acta 52, 91 (1974a)

MATTHIAS, F.R., D.L. HEENE and Z. WEGRZYNOWICZ:
Reduction of insolubilized fibrinogen
Thrombosis Research 1974b, im Druck

MATTHIAS, F.R., D.L. HEENE und R. REINICKE:
Über einen Test zur Erfassung von Fibrinmonomeren bei
Krankheitsbildern mit Hyperkoagulabilität
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, (1974c) im Druck

MAXWELL, R.E.:

Removal of plasminogen and factor XIII from fibrinogen
Nature 218, 1268 (1968)

MCDONAGH, R.P., J. MCDONAGH, M. BLOMBÄCK and B. BLOMBÄCK:

Crosslinking of human fibrin: Evidence for intermolecular crosslinking involving α -chains
FEBS Lett. 14, 33 (1971)

MCDONAGH, R.P., J. MCDONAGH and B. BLOMBÄCK:

Polypeptide chains of human fibrin: Molecular organization in cross-linking
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 335 (1972a)

MCDONAGH, J., B. HESSEL, R.P. MCDONAGH, G. MURANO and B. BLOMBÄCK:

Molecular weight analysis of fibrinogen and fibrin chains by an improved sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis method
Biochim. Biophys. Acta 257, 135 (1972b)

MCKEE, P.A., L.A. ROGERS, E. MARLER and R.L. HILL:

The subunit polypeptides of human fibrinogen
Arch. Biochem. Biophys. 116, 271 (1966)

MCKEE, P.A., P. MATTOCK and R.L. HILL:

Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin
Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 738 (1970)

MCKEE, P.A., M.L. SCHWARTZ, S.V. PIZZO and R.L. HILL:

Cross-linking of fibrin by fibrin-stabilizing factor
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 127 (1972)

MELLIGER, E.J.:

Detection of fibrinogen degradation products by use of antibody coated latex particles
Thrombos. Diathes.haemorrh. 23, 211 (1970)

MERSKEY, C., G.J. KLEINER and A.J. JOHNSON:

Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment
Blood 28, 1 (1966)

MERSKEY, C., P. LALEZARI and A.J. JOHNSON:

Rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 131, 871 (1969)

MIHALYI, E.:

Properties of fibrin dissolved in urea solutions
Acta Chem. Scand. 4, 344 (1950a)

MIHALYI, E.:

Electrophoretic investigation of fibrin and fibrinogen dissolved in urea solutions
Acta Chem. Scand. 4, 351 (1950b)

MIHALYI, E.:

Physicochemical studies of bovine fibrinogen.
III. Optical rotation of the native and denatured molecule
Biochim. Biophys. Acta 102, 487 (1965)

MIHALYI, E.:

Structural aspects of fibrinogen
in: LAKI, K. (Ed.): Fibrinogen
Marcel Dekker Inc., New York 1968, p. 61

MIHALYI, E.:

Review of the physicochemistry of bovine fibrinogen with special reference to its proteolytic fragmentation
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 39, 43 (1970)

MILLS, D.A.:

A molecular model for the proteolysis of human fibrinogen by plasmin
Biochim. Biophys. Acta 263, 619 (1972)

MILLS, D. and S. KARPATKIN:

Heterogeneity of human fibrinogen: possible relation to proteolysis by thrombin and plasmin as studied by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 206 (1970)

MILLS, D. and S. KARPATKIN:

The initial macromolecular derivatives of human fibrinogen produced by plasmin
Biochim. Biophys. Acta 271, 163 (1972)

MOSESSON, M.W.:

The preparation of human fibrinogen free of plasminogen
Biochim. Biophys. Acta 57, 204 (1962)

MOSESSON, M.W.:

The fibrinogenolytic pathway of fibrinogen catabolism
Thrombosis Research 2, 185 (1973)

MOSESSON, M.W. and J.S. FINLAYSON:

Subfractions of human fibrinogen. Preparation and analysis
J. Lab. Clin. Med. 62, 663 (1963)

MOSESSON, M.W. and S. SHERRY:

The preparation and properties of human fibrinogen of relatively high solubility
Biochemistry 5, 2829 (1966)

MOSESSON, M.W., N. ALKJAERSIG, B. SWEET and S. SHERRY:
Human fibrinogen of relatively high solubility. Comparative biophysical, biochemical and biological studies with fibrinogen of lower solubility
Biochemistry 6, 3279 (1967)

MOSESSON, M.W., J.S. FINLAYSON, R.A. UMFLEET and D. GALANAKIS:
Human fibrinogen heterogeneities. I. Structural and related studies of plasma fibrinogens which are high solubility catabolic intermediates
J. Biol. Chem. 247, 5210 (1972a)

MOSESSON, M.W., J.S. FINLAYSON and R.A. UMFLEET:
Human fibrinogen heterogeneities. III. Identification of chain variants
J. Biol. Chem. 247, 5223 (1972b)

MOSESSON, M.W., J.S. FINLAYSON and D.K. GALANAKIS:
Studies on the recovery of fragment D from plasmic digests of fibrinogen
IVth Congr. Intr. Soc. Thrombos. Haemostas., Wien 1973a, Abs. No. 235

MOSESSON, M.W., J.S. FINLAYSON and D.K. GALANAKIS:
The essential covalent structure of human fibrinogen evinced by analysis of derivatives formed during plasmic hydrolysis
J. Biol. Chem. 248, 7913 (1973b)

MÜLLER-BERGHHAUS, G., L. ROKA und H.G. LASCH:
Fibrinmonomere und das Sanarelli-Schwartzmann Phänomen
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77, 161 (1971)

MURANO, G., B. WIMAN and B. BLOMBÄCK:
Human fibrinogen: Some characteristics of its S-carboxymethyl derivative chains
Thrombosis Research 1, 161 (1972)

NANNINGA, L.B. and M.M. GUEST:
Preparation and properties of anticoagulant split product of fibrinogen and its determination in plasma
Thrombos. Diathes. haemorrh. 17, 440 (1967)

NIEWIAROWSKI, S. and E. KOWALSKI:
Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène
Rev. Hémat. 13, 320 (1958)

NIEWIAROWSKI, S., G.J. STEWART and V.J. MARDER:
Formation of highly ordered polymers from fibrinogen and fibrin degradation products
Biochim. Biophys. Acta 221, 326 (1970)

NIEWIAROWSKI, S. and M. NANDI:
Acrylamide gel electrophoresis of fibrinogen and fibrin degradation products
Brit. J. Haemat. 21, 71 (1971)

NIEWIAROWSKI, S. and V. GUREWICH:
Laboratory identification of intravascular coagulation. The serial dilution protamine sulfate test for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products
J. Lab. Clin. Med. 77, 665 (1971)

NILEHN, J.-E.:
Split products of fibrinogen after prolonged interaction with plasmin
Thrombos. Diathes. haemorrh. 18, 89 (1967)

NILSSON, J.L.G., P. STENBERG, Ch. LJUNGGREN and K.-J. HOFFMAN:
Fibrin-stabilizing factor inhibitors
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 286 (1972)

NUSSENZWEIG, V. et M. SELIGMANN:
Analyse par des méthodes immunochimiques, de la dégradation par la plasmine du fibrinogène humain et de la fibrine, à différentes stades
Rev. Hémat. 15, 451 (1960)

NUSSENZWEIG, V., M. SELIGMANN, J. PELMONT et P. GRABAR:
Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. I. Séparation et propriétés physicochimiques
Ann. Inst. Pasteur 100, 377 (1961a)

NUSSENZWEIG, V., M. SELIGMANN et P. GRABAR:
Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. II. Etude immunologique: mise en évidence d'anticorps antifibrinogène natif possédant des spécificités différentes
Ann. Inst. Pasteur 100, 490 (1961b)

PISANO, J.J., J.S. FINLAYSON and M.P. PEYTON:
Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII:
 ϵ - (γ -glutamyl)lysine
Science 160, 892 (1968)

PISANO, J.J., J.S. FINLAYSON, M.P. PEYTON and Y. NAGAI:
 ϵ -(γ -glutamyl)lysine in fibrin: lack of crosslink formation in factor XIII deficiency
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 770 (1971)

PISANO, J.J., T.J. BRONZERT and M.P. PEYTON:
 ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-links: determination in fibrin from normal and factor XIII-deficient individuals
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202, 98 (1972)

PIZZO, S.V., M.L. SCHWARTZ, P. MATTOCK, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

Correlation of clottability of purified human fibrinogen with its digestion by purified human plasmin
J. Lab. Clin. Med. 76, 892 (1970)

PIZZO, S.V., M.L. SCHWARTZ, R.L. HILL and P. MCKEE:

The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen
J. Biol. Chem. 247, 636 (1972a)

PIZZO, S.V., M.L. SCHWARTZ, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

Comparison of the subunit structures of plasmin digested fibrinogen and fibrin
Fed. Proc. 31, 261 (1972b)

PIZZO, S.V., M.L. SCHWARTZ, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin
J. Biol. Chem. 248, 4574 (1973a)

PIZZO, S.V., L.M. TAYLOR, M.L. SCHWARTZ, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-linked fibrin
J. Biol. Chem. 248, 4584 (1973b)

FLOW, E.F. and T.S. EDGINGTON:

The D:E complex: A native conformational component of the fibrinogen molecule
Thrombosis Research 1, 605 (1972)

FLOW, E. and T.S. EDGINGTON:

Immunobiology of fibrinogen emergence of neoantigenic expressions during physiologic cleavage in vitro and in vivo
J. Clin. Invest. 52, 237 (1973)

FLOW, E.F. and T.S. EDGINGTON:

The number of D and E regions in the fibrinogen molecule
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 158 (1974)

POUIT, L., G. MARCILLE, M. SUSCILLON et D. HOLLARD:

Etude en microscopie électronique de différentes étapes de la fibrino-formation
Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 559 (1972)

PORATH, J., R. AXEN and S. ERNBAC:

Chemical coupling of proteins to agarose
Nature 215, 1491 (1967)

PORATH, J. and N. FORNSTEDT:

Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchangers
J. Chromatog. 51, 479 (1970)

PORTER, K.R. and C.V.Z. HAWN:

Sequences in the formation of clots from purified bovine fibrinogen and thrombin: a study with the electron microscope

J. Exp. Med. 90, 225 (1949)

ROBERTS, P.S.:

Measurement of the rate of plasmin action on synthetic substrates

J. Biol. Chem. 232, 285 (1958)

ROBERTS, P.S. and P.B. FLEMING:

The effects of salts and ionic strength on the hydrolysis of TAME (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester) by thrombin and thrombokinase

Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 573 (1972)

SASAKI, T., I.H. PAGE and J.R. SHAINOFF:

Stable complex of fibrinogen and fibrin

Science 152, 1069 (1966)

SCHEIDEGGER, J.J.:

Une micro méthode de l'immuno électrophorèse

Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

SCHERAGA, H.A. and M. LASKOWSKI:

The fibrinogen-fibrin conversion

Advanc. Protein Chem. 12, 2 (1957)

SCHWARTZ, M.L., S.V. PIZZO, P. MATTOCK, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

A simple definitive assay for Factor XIII deficiency

J. Lab. Clin. Med. 76, 893 (1970)

SCHWARTZ, M.L., S.V. PIZZO, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin stabilizing factor)

J. Biol. Chem. 246, 5851 (1971a)

SCHWARTZ, M.L., S.V. PIZZO, R.L. HILL and P.A. MCKEE:

The effect of fibrin-stabilizing factor on the subunit structure of human fibrin

J. Clin. Invest. 50, 1506 (1971b)

SEEGERS, W.H., M.L. NIEFT and J.M. VANDENBELT:

Decomposition products of fibrinogen and fibrin

Arch. Biochem. Biophys. 7, 15 (1945)

SHAINOFF, J.R. and I.H. PAGE:

Cofibrins and fibrin-intermediates as indicators of thrombin activity in vivo

Circ. Res. 8, 1013 (1960)

SHAINOFF, J.R. and I.H. PAGE:

Significance of cryofibrin in fibrinogen-fibrin conversion

J. exp. Med. 116, 687 (1962)

SHERMAN, L.A., A.P. FLETCHER and S. SHERRY:

In vivo transformation between fibrinogens of varying ethanol solubilities: A pathway of fibrinogen catabolism

J. Lab. Clin. Med. 73, 574 (1969a)

SHERMAN, L.A., M.W. MOSESSON and S. SHERRY:

Isolation and characterization of the clottable low molecular weight fibrinogen derived by limited plasmin hydrolysis of human fraction I-4

Biochemistry 8, 1515 (1969b)

SHERRY, S. and W. TROLL:

The action of thrombin on synthetic substrates

J. Biol. Chem. 208, 95 (1954)

SHULMAN, S.:

The size and shape of bovine fibrinogen. Studies of sedimentation, diffusion and viscosity

J. Am. Chem. Soc. 75, 5846 (1953)

SILBERMAN, S., M.B. BERNIK, E.V. POTTER and H.C. KWAAN:

Effects of Ancrod (Arvin) in mice: Studies of plasma fibrinogen and fibrinolytic activity

Brit. J. Haemat. 24, 101 (1973)

SMITH, G.F. and N.U. BANG:

Formation of soluble fibrin polymers. Fibrinogen degradation fragments D and E fail to form soluble complexes with fibrinmonomer

Biochemistry 11, 2958 (1972)

SÖDERQVIST, T. and B. BLOMBÄCK:

Fibrinogen structure and evolution

Naturwissenschaften 58, 16 (1971)

STEINER, R.F. and K. LAKI:

Light scattering studies on the clotting of fibrinogen

Arch. Biochem. Biophys. 34, 24 (1952)

STRAUGHN, W., III and R.H. WAGNER:

A simple method for preparing fibrinogen

Thrombos. Diathes. haemorrh. 16, 198 (1966)

SWANK, R.T. and K.D. MUNKRES:

Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate

Anal. Biochem. 39, 462 (1971)

SWIGERT, S., J.L. KOPPEL and J.H. OLWIN:
Selective inactivation of fibrin stabilizing factor
contaminant in fibrinogen
Nature 198, 797 (1963)

TAKAGI, T. and S. IWANAGA:
Isolation and characterization of the polypeptide chain
involved in the cross-linking of stabilized bovine
fibrin
J. Biochem. 69, 699 (1971)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, D.C.:
Anticoagulant effect of incubated fibrinogen
Can. J. Biochem. Physiol. 36, 249 (1958)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, D.C.:
Effects of intravenous injections of the anticoagulant
fraction of incubated fibrinogen on blood coagulation
Can. J. Biochem. Physiol. 38, 909 (1960)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, D.C.:
Anticoagulant action of TAME and AFIF
Am. J. Physiol. 200, 771 (1961)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, E. and D.C. TRIANANTAPHYLLOPOULOS:
Coagulation studies on the electrophoretic fractions
of AFIF
Am. J. Physiol. 203, 595 (1962)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, D.C. and E. TRIANANTAPHYLLOPOULOS:
Effect of fibrin(ogen) degradation products on coagu-
lation
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 47, 121 (1971)

TRIANANTAPHYLLOPOULOS, D.C. and M. TORRES:
The coagulability of partially lysed fibrinogen.
Effect of pH and ionic strength
Thrombos. Diathes. haemorrh. 25, 346 (1971)

VERMYLEN, J., M.B. DONATI and M. VERSTRAETE:
The identification of fibrinogen derivatives in plasma
and serum by agarose gel filtration
Scand. J. Haemat. Suppl. 13, 219 (1971)

WALKER, L. and A. CATLIN:
A simplified method for preparation of fibrinogen
Thrombos. Diathes. haemorrh. 26, 99 (1971)

WALLEN, P.:
Plasmic degradation of fibrinogen
Scand. J. Haematol. Suppl. 13, 3 (1971)

WALLEN, P. and K. BERGSTRÖM:

Action of thrombin on plasmin digested fibrinogen
Acta Chem. Scand. 12, 574 (1958)

WARE, A.G., M.M. GUEST and W.H. SEEGER:

Fibrinogen: With special reference to its preparation
and certain properties of the products
Arch. Biochem. 13, 231 (1947)

WEBER, K. and M. OSBORN:

The reliability of molecular weight determinations by
dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

WEGRZYNOWICZ, Z., M. KOPEC and Z.S. LATALLO:

Formations of soluble fibrin complexes and some factors
affecting their solubility
Scand. J. Haemat. Suppl. 13, 49 (1971)

WEGRZYNOWICZ, Z., M. KLOCZEWIAK and M. KOPEC:

Tritium labelled fibrinogen. Its properties and application
for examination of the enzymatic phase of coagulation

IVth Congr. Int. Soc. Thrombos. Haemostas., Wien 1973,
Abs. No. 87

WEGRZYNOWICZ, Z., M. KLOCZEWIAK and M. KOPEC:

Tritiated bovine fibrinogen, labelled in fibrinopeptide
A region
J. Lab. Clin. Med. 1974, im Druck

WOODS, K.R., M.S. HOROWITZ and B. BLOMBÄCK:

Effect of thrombin on the molecular weights of N-terminal
fragments of human fibrinogen
Thrombosis Research 1, 113 (1972)

ZOLTON, R.P. and E.T. MERTZ:

Studies on plasminogen. X. Isolation of plasminogen
by affinity chromatography using Sepharose-Butesin
Can. J. Biochem. 50, 529 (1972)

